

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie

Studijní program: Biologie



Bc. Barbora Gabrielová

Kondiční závislost druhotných ornamentů a výběr partnera u koroptve polní (*Perdix perdix*)

Condition dependence of secondary ornamentation and mate choice in Grey Partridges
(*Perdix perdix*)

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Tomáš Albrecht Ph.D.
Konzultant: RNDr. Michal Vinkler

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

Poděkování:

Za konzultace, odborné rady, vedení a trpělivost děkuji svému školiteli doc. Mgr. Tomáši Albrechtovi, Ph.D. a svému konzultantovi RNDr. Michalu Vinklerovi. Za podporu při psaní patří poděkování také mému příteli, mé rodině a nejbližším přátelům.

Abstrakt

Práce se snaží objasnit vztah kondice, míry exprese ornamentu a výběr partnera u populace druhu koroptve polní (*Perdix perdix*). Sestává z části korelativní a manipulativní. V korelativní části práce byl sledován vliv kondičních parametrů na ornamentaci u divoké populace tohoto druhu a samičí preference pro ornament. Zde byla zjištěna souvislost mezi velikostí a barvou ornamentů. Velikost i barva karotenoidního proužku a velikost melaninové podkovy souvisí s imunitními funkcemi a kondicí organismu (komplementová aktivita, poměr imaturních erytrocytů, HL, odpověď na PHA). Dále byl zjištěn vliv karotenoidního ornamentu na rychlost párování samce. Na uměle odchovaných jedincích se byla nejdříve ověřena přítomnost karotenoidů v červeném kožním znaku za okem a poté bylo v pokusu manipulováno s hladinami přijímaných karotenoidů a stimulací imunity. Byla testována tzv. „Carotenoid maintenance“ hypotéza, která předpokládá spíše negativní vliv karotenoidů na zdraví jedince a expresi ornamentu, která se nicméně nepotvrdila. Podávání karotenoidů vedlo pouze ke zlepšení červenosti a stimulace imunitního systému měla prokazatelný negativní vliv pouze na hmotnost jedince. Práce přispívá k objasnění role ornamentů v signalizaci kondice jedince.

Klíčová slova: koroptev polní (*Perdix perdix*), karotenoidy, ornament, výběr partnera, kondice, CMH

Abstract

This study focuses on relationships between individual condition, measures of ornament expression and mate choice in the Grey Partridge (*Perdix perdix*). It is based on the correlative data as well as results of manipulative experiments. I found positive correlation between the size of melanin- and carotenoid-based ornaments in partridges. The size and the redness of the carotenoid skin patch, and the size of the melanin-based feather ornamentation were associated with several measures of immunity and overall body condition (complement activity, ratio of immature erythrocytes, heterophil/leucocyte ratio, response to novel antigen). Furthermore, data from natural populations indicate that the expression of carotenoid-based ornamentation is associated with sexual attractiveness (measured as the ability to obtain a social mate) in partridges. Data from captive individuals indicate that carotenoid supplementation improves the redness of carotenoid-based ornament, while the stimulation of the immune system under increasing concentrations of supplemented carotenoids has no measurable effect on condition and physiological state. This seems to contradict predictions of the 'Carotenoid maintenance hypothesis'. Overall, results better understanding the role of carotenoid and melanin-based ornamentation in signaling health/condition and indicate the role of secondary male ornamentation mate in choice decisions in the Grey Partridge.

Key words: Grey partidge, carotenoids, ornamentat, mate choice, condition, CMH
(Carotenoid maintenace hypotesis)

Obsah

1. Úvod	7
1.1. Karotenoidy a ornamenty	8
1.2. Souvislost ornamentů a kondice - trade-off	15
1.3. Role karotenoidních ornamentů v pohlavním výběru	23
1.4. Koroptev polní (<i>Perdix perdix</i>)	25
1.5. Cíle práce:	27
2. Metodika	28
2.1. Divoká populace	28
2.1.1. Sběr vzorků a dat	28
2.1.2. Analýza dat	30
2.1.2.1. Charakteristiky ornamentů	30
2.1.2.2. Imunologické parametry	32
2.1.2.3. Ověření přítomnosti karotenoidů	34
2.2. Vliv suplementace na expresi ornamentu – experimentální design	35
2.3. Statistické vyhodnocování dat	38
3. Výsledky	42
4. Diskuze	62
5. Závěr	69
6. Literatura	70

1. Úvod

Existuje celá řada znaků, jimiž se ptáci řídí při výběru partnera. Mezi ty nejdůležitější patří optické signály a zvláště barvené ornamenty, na jejichž vzniku a udržení se významně podílí právě pohlavní výběr (Darwin, 1871; Andersson, 1994). Výrazné ornamenty se objevují u druhů s pohlavním dimorfismem častěji u samců (A. V. Badyaev & Geoffrey E Hill 2000). Snaha o vývoj maximálního ornamentu může být velmi nákladná a mnohdy snižuje životaschopnost svého nositele (Zahavi, 1975). Pak ale zůstává otázkou, proč se samci vyplatí takové znaky udržovat a proč si samice takového samce vybírá. Aby byly ornamenty využitelné v signalizaci, je třeba, aby byly čestnými signály (honest signals) kvality svého nositele. Aby byly čestné, musí být jejich vývoj, či udržování nákladné. Tímto se zabývá indikátorový model pohlavního výběru, který předpokládá, že pokud je signál čestný, a tudíž i nákladný na vývoj či udržení znaku, je pro samici výhodné vybrat si takového samce, kterému přítomnost nákladného znaku nevadí (Zahavi, 1975). Ornamenty mohou sloužit příjemci signálu jako ukazatelé kvality jedince a jejich přítomnost by měla souviset se zdravím organismu a kondicí.

Tato práce má za cíl zhodnotit signální význam ornamentů u druhu koroptve polní (*Perdix perdix*). Tento druh vytváří jak péřový melaninový, tak i kožní karotenoidní ornament, které mohou být využity v pohlavním výběru, přítomnost obou těchto ornamentů u jednoho jedince je potenciálně zajímavá, neboť každý může informovat příjemce signálu o jiném parametru kondice jedince. V této práci se zaměřuji hlavně na význam karotenoidních ornamentů, jako ukazatelů kondice jedince, a jejich využití v pohlavním výběru.

1.1. *Karotenoidy a ornamenty*

Ornamenty mohou být zbarveny pomocí různých pigmentů. Využívanými pigmenty pro ornamentaci jsou melaniny, karotenoidy, psitacofluvin (papoušci), železité oxidy, prokrvení daného místa a další (např. Stoddard & Prum, 2011). Existuje předpoklad, že různé pigmenty mají různý informační obsah (Kevin J McGraw et al. 2002). Melaninové ornamenty mohou signalizovat dominanci a agresivitu jedince (Senar 1999; McGraw et al. 2003; Ducrest et al. 2008). Karotenoidy mohou sloužit jako čestný signál samčí kvality, neboť si je tělo nedokáže samo vyrobit (Fox 1976, Gray 1996) a jejich depozice do ornamentu je nákladná (Hill 2000). Jinou informaci může dát příjemci signálu obsah pigmentů anebo velikost a symetrie ornamentu (Badyaev et al. 2001). Melaniny a karotenoidy (ale i jiné pigmenty) se dají od sebe rozpoznat jednoduše podle rozdílné křivky na spektrometru, což může být první metoda určení pigmentového složení při terénních výkumech (Toral et al. 2008). Zatímco melaniny jsou vytvářeny v organismu (Fox 1976), karotenoidy si musí jedinec obstarávat z potravy, neboť jejich výroby jsou schopné pouze fotosyntetizující organismy a některé nefotosyntetizující bk (Armstrong & Hearst 1996).

Karotenoidy dělíme na karoteny, jejichž molekula není substituovaná a xantofyly, které jsou oxidované (Britton, 1995). Karoteny jsou nepolární, rozpustné v tucích, mají provitaminovou aktivitu, xantofyly jsou polárnější (dělí se na hydroxy- lutein, žluté a keto-astaxanthin, červené) a jsou využívány jako pigmenty ve zbarvení ornamentů u mnoha druhů ptáků.

Karotenoidy jsou dlouhé lineární uhlíkaté molekuly, obsahující konjugované dvojné vazby. Ty je důležité zmínit ze dvou důvodů – jednak vytváří delokalizovaný systém elektronů a molekuly jsou díky tomu schopny zachytit energii z okolí (například volný radikál, singletový kyslík) absorbovat ji, rozvibrovat svojí molekulu a vyzářit tuto energii ve formě tepla. Takto mohou v organismu zastávat antioxidační funkci a bránit jeho poškození, tato vlastnost byla zkoumána spíše in vitro (Foote and Denny 1968; Burton 1989; Bendich 1989), proto je otázkou do jaké míry tyto schopnosti mají také v živých organismech (Britton 1995; Hartley and Kennedy 2004). Druhý význam těchto dvojných vazeb je, že způsobují barevnost karotenoidů.

Karotenoidy patří mezi hojně zastoupené pigmenty v živočišné i rostlinné říši a vytvářejí spektrum barev od žluté po červenou (Brush & Power 1976). Mnoho druhů

zvířat, zvláště ryb a ptáků, využívá tuto vlastnost k vytváření barevných ornamentů, které se mohou uplatnit v pohlavním výběru (Andersson, 1994). Jelikož si jedinci nejsou schopni vyrobit karotenoidy *de novo*, konečné množství karotenoidů, které se může uplatnit v organismu je tak omezeno jednak příjmem a jednak absorpcí (Hill 1995).

Příjem závisí z části na vyhledávacích schopnostech jedince. Absorpce a metabolismus je záležitostí celkové kondice jedince, funkcí jeho trávicí soustavy (Brush & Power 1976). Bylo potvrzeno, že absorpce je závislá na složení potravy (Parker, 1996) – lépe se vstřebávají v přítomnosti tuků (Roodenburg et al. 2000, Clark a Furr, 2001), naopak vláknina jejich vstřebávání ovlivňuje negativně (Yonekura a Nagao, 2009). Živočiškové živíci se pouze rostlinnou stravou, tak mohou mít snížené procento vstřebaných karotenoidů z potravy (Castenmiller a West 1998). Absorpce také závisí na množství a poměru karotenoidů v potravě (Clark et al. 1998, Bierer et al. 1995; White et al. 1993), celkové dostupnosti potravy (Hill 2000; McGraw et al. 2001; Hill et al. 2009). Ptáci preferenčně vstřebávají xantofyly před karoteny (Schiedt 1998). Díky tomu, že vstřebávání karotenoidů je závislé na přítomnosti tuků, je možné, že je pasivní a tudíž vstřebávání karotenoidů v tomto směru nepředstavuje náklady na vznik ornamentu (Parker 1996; Furr et al. 1997). Organismus je schopen využívat karotenoidy jen do určitého přijatého množství, existuje tedy určité plato v příjmu karotenoidů a nadbytečné karotenoidy jsou vyloučeny (Alonso-alvarez et al. 2004) Ho et al. 2007), či uloženy v zásobních tkáních (játra, tuková tkáň, integument, svaly, vaječníky a varlata, (Parker 1989; McGraw et al. 2004; Negro et al. 2000)). Není jisté, jestli se tyto zásobní karotenoidy mohou zpětně využít pro ornamentaci, ovšem McGraw et al. (2011) zjistil, že v případě dlouhodobého stresu při kterém jedinec zhubnul, produkoval ve výsledku tmavší ornament, je tedy možné, že karotenoidy uvolněné z tukových zásob deponoval do ornamentu. V krvi se karotenoidy přepravují pomocí lipoproteinů (Erdman et al. 1993). Metabolismus karotenoidů není stále plně prozkoumán. Je však prokázáno, že jsou akumulovány v tělech živočichů ve vysokých množstvích (Hill 1999; Møller et al. 2000).

Ptáci využívají pro ornamentaci jednak karotenoidy přijaté z potravy, jednak jsou schopni metabolizace přijatých karotenoidů pro využití v ornamentu (Hill 1996, Hill 2000, Stradi et al. 2001). Přijaté karotenoidy, se při tomto procesu oxidují, což způsobí obvykle zčervenání molekuly (Mortensen et al. 1997). Není ovšem jisté, do jaké míry mohou ptáci přeměňovat karotenoidy pro využití v ornamentaci (McGraw et al. 2004) a zda se jedinci nevyplatí investovat spíše do hledání barevnějšího karotenoidu v přírodě, namísto předpokládané nákladné metabolizace. Obě možnosti ale představují náklady spojené se

vznikem ornamentu. Nejběžnějšími karotenoidy v přírodě jsou lutein a zeaxanthin a ty jsou také u mnoha druhů v ornamentaci nejvyužívanější (McGraw et al. 2001). Využitelnost karotenoidů se ovšem liší mezi druhy, pěvci například absorbují více karotenoidů z potravy než hrabaví (McGraw 2005). Existuje i věkově specifická využitelnost karotenoidů (Manning 1985, (Quesada et al. 2010)). Mladí ptáci často nepřeměňují karotenoidy před vystavením do ornamentu (Inouye et al. 2001), čili barva se liší od dospělců. Ornamenty se mění v průběhu života (Brooks & Kemp 2001). Barva karotenoidních ornamentů se liší v průběhu roku (Evans et al. 2012).

Barva ornamentu může vyjadřovat poměr obsažených pigmentů (Inouye et al. 2001; Saks et al. 2003; Hill et al. 2002). Nejspíše existuje nějaký specifický biochemický mechanismus ke kontrole exprese barev, jehož pochopení může být důležité pro pochopení nákladů na vznik a udržení ornamentu (McGraw et al. 2002), např. druh vazebného proteinu, který by měl větší afinitu k určitému karotenoidu (McGraw et al. 2003), akumulace většího množství karotenoidů (rozdíly v barvě = rozdíly ve vyhledávání potravy bohaté na karotenoidy (McGraw & Gregory 2004)). Výsledná barva ale může být ovlivněna také špatnou funkcí trávicího systému (např. přítomností parazita), poměrem karotenoidů v potravě a celkovým množstvím přijaté potravy v době vzniku ornamentu (Hill 2000; McGraw et al. 2001; (Hill et al. 2009; McGraw & Hill 2000) – variabilita v barvě by tak měla být podmíněna hlavně rozdíly v příjmu karotenoidů, což bylo potvrzeno (Hill et al. 1994, Hill 1992)). Rozdíly v absorpci se naproti tomu testují hůře, zvláště proto, že přesný metabolismus karotenoidů a jejich osud v tělech živočichů stále neznáme. Jako hlavní místo metabolismu karotenoidů pro potřeby ornamentu byla navržena játra (Hill 2000), jako hlavní metabolický orgán. McGraw et al. (2004, 2009) naproti tomu navrhl přeměnu až v cílových tkáních. U 11 druhů pěvců, kteří vytvářejí péřové karotenoidní ornamenty, izoloval karotenoidy z jater, krve a ornamentů a zjistil, že výsledné karotenoidy z ornamentu chyběly v krvi i játrech, a v rostoucích folikulech per nalezl jak přijaté, tak i metabolizované karotenoidy. Možné vysvětlení je, že metabolizace je nákladná a při transportu by se vzniklé karotenoidy mohly poškodit. Je ale možné, že nebyl schopen detekovat pigmenty v krvi a játrech, kvůli nevyhovující metodě a karotenoidy se skutečně metabolizují v játrech (Val, Senar et al. 2009). Barva souvisí i s množstvím karotenoidů v plasmě a s množstvím lipoproteinů jako jejich hlavních nosičů (Kevin J McGraw & R. S. Parker 2006).

Potenciálně zajímavou vlastností karotenoidů je jejich antioxidační schopnost. Pokud fungují jako antioxidanty, mohou zachytávat volné radikály (Monaghan et al. 2009;

Perez-Rodriguez et al. 2008; Cohen et al. 2009), které vznikají při běžné činnosti buněk (zvláště buněk imunitního systému) a tyto jsou vysoce reaktivní a nestabilní. Antioxidanty jsou potřebné pro udržení optimálního oxidativního stavu a správnou funkci organismu. Pokud je jich málo, radikály nadměrně poškozují buňky těla a mluvíme o oxidativním stresu. Díky dlouhým nestabilním řetězcům jsou karotenoidy velmi náchylné ke štěpení (Britton 1995), při němž jsou nenávratně zničeny a vznikají apo a norkarotenoidy, případně karotenoidní radikály (Davies, 1985; Azzi et al. 2004; Edge & Truscott 1997; Siems et al. 2005). Ty již nemají barevné vlastnosti původních karotenoidů (nemohou být využity v ornamentu) a navíc jsou pro organismus toxické (Siems et al. 2000; Siems et al. 2005). Mimo jiné inhibují růst, souvisí s apoptozou a jsou imunosupresivní (Kalariya et al. 2008; C Salerno et al. 2005; A. Nagao 2004; Nara et al. 2001). Pokud tedy karotenoidy nespolečně spolupracují v rozsáhlé síti jiných antioxidantů (vitamin C a E; Sies 1993, Liu et al. 2004; endogenní antioxidační enzymy; Monaghan et al. 2009; Catoni et al. 2008; von Schantz et al. 1999), je možné, že jsou spíše škodlivé, než zdraví prospěšné (Siems et al. 2005; Rao & Rao 2007; Kalariya et al. 2008; Monaghan et al. 2009). Je třeba, aby antioxidanty působily synergicky a předávaly si volný elektron až do utlumení jeho energie (Böhm et al. 1998; Edge et al. 1997; Cohen et al. 2008; Cohen et al. 2009b). Antioxidační schopnosti karotenoidů zatím nebyly prokázány in vivo (Young et al. 2001, ale Constantini a Moller 2008). Jejich antioxidační vlastnosti jsou závislé i na parciálním tlaku kyslíku (Edge et al. 1997; Palozza 1998; Siems et al. 2005). Pokud se reaktivních radikálů v prostředí vyskytuje hodně (stres, nemoc) a organismus nemá dostatečnou zásobu karotenoidů využitelných pro antioxidaci a/nebo neexistuje dostatek jiných antioxidantů, pak se antioxidační vlastnost karotenoidů může zvrátit v prooxidační (Edge et al. 1997; Siems et al. 2005; Mordt et al. 1993).

Pokud předpokládáme, že výsledné ornamenty mají funkci v signalizaci stavu kondice u živočichů, liší se kožní a peřové ornamenty i jako ukazatelé kondice (Blount et al. 2003). Zatímco peřové ornamenty ukazují na dostupnost karotenoidů a celkový zdravotní stav v době přepeřování, kožní ornamenty mohou ukazovat okamžitou koncentraci karotenoidů v potravě (Hill et al. 2009). Existuje totiž předpoklad, že pro potřeby ornamentu si jedinci karotenoidy neskladují, proto by kožní ornamenty měly ukazovat aktuální kondici jedince a odpovídat na krátkodobé změny kondice (Faivre et al. 2003; Hill et al. 2009). Tyto ornamenty by měly být nejlépe využitelné v pohlavním výběru, neboť samec ukazuje svou aktuální kondici. Což ovšem neznamená, že samice při výběru partnera nezohledňuje i jiná kritéria, například kondici v době přepeřování, kondice

by totiž mohla korelovat mezi jednotlivými částmi roku (Hegemann et al. 2012). Barva může být ovlivněna i mechanickým odřením (Barrowclough 1980), přítomností parazitů, stresem, tyto parametry ovlivňují celkový stavu integumentu (Fitze et al. 2002, Shawkey et al. 2009, Hill et al. 2004, Figuerola a Senar 2005). Tyto vlivy ale působí především na jednu složku barvy ornamentu, kterou je jas barvy (brightness). Ostatní parametry barvy by mohly být ovlivněny jinak. V pokusech s podáváním karotenoidů docházelo u péřových ornamentů po přepelichání ke změně barvy (Hill 1992, Hill a Montgomerie 1994, McGraw & Hill 2001) i velikosti ornamentu (Hill 1992).

Exprese sekundárních pohlavních znaků je ovládána také pohlavními hormony (Folstad a Karter 1992). U samců je to většinou testosteron. Samci obratlovců, kteří vytvářejí sezonní partnerské svazky, vykazují strmý nárůst hladiny testosteronu před začátkem pohlavní aktivity. Hladina pak zůstává zvednutá během období rozmnožování a na konci se snižuje (Silverin 1980). Testosteron zvyšuje depozici pigmentu do ornamentu a tím zlepšuje jeho zbarvení, či velikost (Evans et al. 2000; Gonzales et al. 2001, Alonso-Alvarez et al. 2008). Zvýšení hladiny testosteronu vede ke zvýšení produkce lipoproteinů (nosič karotenoidů v krvi) a jedinec tak může produkovat lepší ornament (McGraw et al. 2006). Testosteron mimo jiné zvyšuje i basální metabolismus (Buchanan et al. 2001), zvyšuje tedy i metabolismus tuků a tím i karotenoidů, které jsou s ním těsně spjaty (Negro et al. 2001, McGraw et al. 2002), možná tedy ptáci skutečně dovedou využít pro ornament i skladované zásoby karotenoidů. Testosteron koreluje i s agresivitou (Folstad et al. 1992), čili pokud má samec víc testosteronu, měl by být agresivnější a být schopen si obhájit lepší teritorium a zároveň, díky pozitivnímu vlivu na vývoj ornamentů, mít červenější ornament, kterým tuto schopnost signalizuje. Testosteron může mít i složitější vliv na produkci ornamentů. Samci zebříček mají více karotenoidů v krvi než samice (McGarw et al. 2003) a zároveň mohou mít horší zánět (McGraw a Ardia 2005). Testosteron totiž podle některých výsledků působí imunosupresivně (Folstad et al. 1992, Roberts et al. 2004), existují ale i opačné výsledky (McGraw a Ardia 2007). Je možné, že imunosupresivní není samotný testosteron, ale další hormony. Testosteron totiž zvyšuje hladinu volných kortikosteroidů, která souvisí se stresem (Merrill et al. 2012) a ty pak mohou působit na imunitní systém supresivně (Gala a Westphal 1965). Jedinec pak musí vyrovnávat škodlivé působení těchto hormonů, jejichž působení může vývoj ornamentu ovlivnit nepřímo pomocí působení na imunitní systém. Pokud je jedinec ve stresu (nemoc) produkuje více kortikoidů, které způsobují nižší aktivitu enzymu HMG-CoA reduktázy, který je limitující v syntéze cholesterolu. Cholesterol je základní složka lipoproteinů (nosiče karotenoidů

v krvi), ovlivnění jeho syntézy tedy může vést ke snížení produkce lipoproteinů a tím pádem i ovlivnění barvy karotenoidního ornamentu (Ness a Chambers 2000, Alonso-Alvarez a Galvan 2011). Nicméně podávání testosteronu vedlo u samců k vývoji barevnějšího ornamentu, ale zároveň většímu oxidativnímu poškození (Alonso-Alvarez et al. 2008). Díky tomu, že testosteron zvyšuje agresivitu i oxidační stres, který může negativně působit na karotenoidy a štěpit je (následkem čehož nejsou využitelné pro ornament), může být vysvětleno, proč agresivní samci mohou mít méně zbarvenou skvrnu (McGraw and Hill 2000). Tato trade-off jsou však již předmětem další kapitoly.

Dalším velmi využívaným pigmentem v ornamentech ptáků jsou melaniny, produkující barvy od žluto-hnědé po černou (McGraw 2006). Dělí se na pheomelaniny a eumelaniny. Tyto pigmenty jsou vytvářeny v organismu (Fox 1976), takže se dlouho předpokládalo, že nejsou nákladné na výrobu a že neexistuje fyziologický link mezi kondicí a melaninovými ornamenty (Olson and Owens 1998). A tudíž že nemusely vzniknout jako spolehlivé signály kvality jedince (Griffith et al. 2006). Předpokládá se, že se karotenoidní a melaninový ornament liší v obsahu informace (McGraw a Hill 2000, Senar et al. 2003).

Pro syntézu pheomelaninu je potřeba glutathion (Galvan a Solano 2009). Ten se mimo jiné účastní antioxidační obrany organismu. Ovšem vysoké hodnoty glutathionu v melanocytech (buňky produkující melaniny) blokuji tvorbu eumelaninů (Galvan a Solano 2009). Tak může jeho hladina v těle určit vyvinutí jednoho nebo druhého typu melaninového znaku. Hodnota glutathionu jako antioxidantu ovšem může souviset i s vývojem karotenoidních ornamentů. Tak by tento antioxidant mohl ovlivňovat zbarvení u druhů s více ornamenty.

Existují totiž druhy, které vytvářejí zároveň ornamenty melaninové i karotenoidní, tím se zabývá hypotéza evoluce mnohočetných ornamentů (multiple ornaments; Johnstone 1996). Podle ní, pokud se u jednoho druhu vyskytují oba typy zbarvení, pak buď každý ornament ukazuje příjemci signálu jinou informaci o kvalitě jedince (Candolin 2003, Hebets a Papaj 2005), nebo oba signály poskytují informaci o celkové kvalitě jedince (back-up hypothesis; Johnstone 1996), aby se zmírnily chyby ve vnímání příjemce signálu.

Pokud se snížila hladina glutathionu v krvi, zvětšila se exprese eumelaninového peří u sýkory (*Parus major*; Galván et al. 2008) i zvonka (*Carduelis chloris*; Horak et al. 2010). Nízké hodnoty glutathionu snášely sýkorky zvýšením koncentrace jiných antioxidantů, zatímco *Carduelis* měli větší oxidativní poškození. Při pokusném zvýšení oxidativního stresu během vývoje produkovaly orebice (*Alectoris rufa*) větší eumelaninový

pěřový znak (černý) a zároveň bledší karotenoidní ornamenty (zobák a skvrna za okem; Alonso-Alvarez a Galvan 2011).

1.2. Souvislost ornamentů a kondice - trade-off

Obecně uznávaný předpoklad je, že karotenoidní ornamenty jsou využitelné v pohlavním výběru jako čestné indikátory kvality jedince (Badyaev a Hill 2000). Aby byl signál čestný, musí být nákladný na výrobu či udržení. Pokud je skutečně nákladný, pak je limitován pouze na kvalitní samce, kteří si přítomnost takového znaku mohou dovolit. Navzdory rozsáhlému teoretickému základu a experimentálnímu úsilí v posledních letech, však fyziologický mechanismus souvislosti karotenoidů a jejich deposicí do ornamentů s celkovou kondicí jedince stále není vyřešen.

Existuje několik hypotéz, které se snaží objasnit čestnost karotenoidní signalizace. První je založena na předpokladu, že karotenoidy jsou v prostředí limitující, a s faktem, že živočichové nejsou schopni syntetizovat karotenoidy (McGraw 2006). Navíc tato hypotéza předpokládá, že karotenoidy jsou v prostředí vzácné (Hill, 1996) a karotenoidní ornamenty jsou nákladné na výrobu (Hill, 1996; Hill et al., 2002). Pokud tyto předpoklady platí, pak barevnější ornament může ukazovat individuální kondici jako funkci schopnosti přijmout dostatečné množství těchto pigmentů (Hill 1992; Lozano 1994). Karotenoidy jsou ovšem v prostředí celkem běžné, čímž padá jeden z předpokladů této hypotézy. Expres ornamentu se navíc zdá být limitovaná. Po překročení určité koncentrace v potravě už tělo není schopno karotenoidy dále využívat a jejich koncentrace v krvi (plasmě) se nezvyšuje a ani dále nemají vliv na barvu ornamentu (Alonso-Alvarez et al. 2004; Doolan et al. 2008; Grether et al., 1999).

S tím souvisí další předpokládané zajištění čestnosti signalizace karotenoidních ornamentů. Samotný jejich metabolismus a transport může být energeticky náročný a tak by lépe zbarvený ornament měl signalisovat zdravého a kvalitního jedince (Hill 2000). Jak bylo uvedeno výše, karotenoidy využívají k absorpci stejnou cestu jako tuky, čili je možné, že absorpce je pasivní záležitost a tudíž s ní nejsou spojené výrazné náklady.

Další hypotéza se zabývá antioxidační funkcí karotenoidů. Díky jejich antioxidačnímu potenciálu, mohou být prospěšné pro zdraví jedince (Alonso-Alvarez et al. 2004; Peters 2007; McGraw and Ardia 2007). Pokud fungují jako antioxidanty, mohou zachytávat volné radikály, které vznikají při běžné činnosti buněk (zvláště buněk imunitního systému) a zneškodnit je. Při tom jsou však nevratně zničeny (Vershinin 1999; Kiokias and Gordon 2004). Může tedy existovat trade-off mezi jejich fyziologickým využitím a deposicí do ornamentu (Møller et al. 2000; Hōrak and Saks 2003). Imunitní

system tak kompetuje s ornamenty o přísun karotenoidů. Pokud je zvíře vystaveno oxidativnímu stresu, pak jsou karotenoidy spotřebovávány jako antioxidanty, vznikají jejich nebarevné produkty, které dále nemohou být využity pro ornament, a ten bledne. Jedinec tak prezentuje pomocí ornamentu své zdraví.

Reprodukce a s ní spojený vývoj ornamentů je energeticky náročná aktivita (Rogowitz, 1996), která zvyšuje bazální metabolismus (Angilletta & Sears, 2000), tím pádem se zhorší oxidativní stav a tělo musí vynakládat více prostředků na antioxidační obranu. Zhoršení oxidativního stavu představuje náklady, které jsou spojeny s produkcí ornamentu (Alonso-Alvarez et al., 2004). Exprese ornamentu je ovládána pohlavními hormony, u samců jde hlavně o testosteron, který zlepšuje přístupnost karotenoidů pro ornament (Blas et al. 2006; McGraw et al. 2006; McGraw 2006), ale je zároveň imunosupresivní a zhoršuje oxidativní stav (Wikelski et al. 1999; Buchanan et al. 2001; Alonso-Alvarez et al. 2007). Trade off mezi imunitou a ornamentem tak může být zprostředkováno testosteronem (Peters 2007). Karotenoidy jako antioxidanty mohou vyvážet škodlivý vliv testosteronu, vývoj ornamentu je pak kompromisem mezi pozitivním vlivem testosteronu na množství karotenoidů dostupných pro ornament a jeho negativním vlivem na oxidativní stav.

Některé výsledky diskutují otázku karotenoidů jako antioxidantů (Isaksson et al. 2007; Isaksson and Andersson 2008; Costantini and Møller 2008). Správný antioxidant by neměl vytvářet nebezpečné meziprodukty a měl by spíše zlepšovat, než zhoršovat oxidativní stav organismu (Hartley a Kennedy, 2004). Při antioxidačních reakcích karotenoidů vznikají jejich nebarevné produkty, které jsou zároveň toxické a mohou poškozovat organismus (Edge et al. 1997, Siems et al. 2002), je možné, že karotenoidy proto nejsou samy o sobě antioxidanty (Hartley a Kennedy. 2004, Perez-Rodriguez 2008) a spíše zhoršují oxidativní stav (Siems et al. 2005, Kalariya et al. 2008), a jejich štěpení je tedy nežádoucí. Proto byla navržena alternativní hypotéza (Hartley a Kennedy 2004), jejím předpokladem je, že samy karotenoidy nemají antioxidační funkci, a měly by proto fungovat v synergii s jinými antioxidanty (Edge et al., 1997b; Sies, 1993, Liu et al. 2004). Jejich přítomnost v ornamentu signalizuje jiné nebarevné antioxidační zdroje v organismu (Pike et al. 2007). Při zhoršení oxidativního stavu jsou nebarevné antioxidanty vyčerpány a karotenoidy se štěpí na nebarevné produkty, které dále nemohou být použity pro zbarvení a navíc jsou toxické. Byl tedy navržen možný škodlivý vliv karotenoidů na zdraví jedince (Zahavi 2007).

Čestná signalizace pomocí karotenoidních ornamentů může být zajištěna rovnováhou mezi pozitivní funkcí karotenoidů a škodlivým vlivem jejich štěpných produktů. To závisí na dostupnosti jiných antioxidantů, pokud je jich málo, karotenoidy jsou štěpeny. Jako zprostředkovatel tohoto trade-off by mohl být testosteron. Ten jednak zlepšuje dostupnost karotenoidů pro ornament, ale zároveň zhoršuje oxidativní stav, při kterém se spotřebovávají nebarevné antioxidanty a karotenoidy tak nejsou chráněny před štěpením. Testosteron tak funguje v tomto trade-off jako handicap. Pouze jedinci v dobrém zdravotním stavu jsou schopni ustát vysoké hladiny testosteronu a tím pádem i akumulovat velké množství karotenoidů pro ornament. To zajišťuje čestnou signalizaci, neboť pouze kvalitní jedinci mohou mít nejrozvinutější ornament, jedinci ve špatné kondici trpí působením štěpných produktů. To potvrzuje například výsledek studie McGraw a Ardia (2007), kdy hladiny karotenoidů pozitivně korelovaly s imunitními funkcemi, ale po podání testosteronu se objevila negativní korelace, čili se objevil možný vliv štěpných produktů karotenoidů, které vznikly působením testosteronu.

Obecně se předpokládá, že jedinci chtějí maximalizovat příjem karotenoidů, aby dosáhli nejčervenějšího zbarvení ornamentu. Je otázka, jestli je pro zvířata přijímání co největšího množství karotenoidů pro nejbarevnější ornament výhodou. Ve vysokých dávkách se působení karotenoidů ukazuje spíše jako škodlivé. Díky tomu, že karotenoidy nemusí mít vždy pouze kladný vliv na celkové zdraví, byla navržena hypotéza (Albrecht, Vinkler 2009, Carotenoid maintenance hypothesis, dále jen CMH), která předpokládá, že jedinci by měli spíše optimalizovat než maximalizovat příjem karotenoidů, neboť velké množství karotenoidů v organismu může představovat handicap a jen nejlepší jedinci si mohou dovolit udržovat vysoké hladiny karotenoidů pro rozvinutí ornamentu (Bertrand et al. 2006; Pike et al., 2007). Pro zdravé jedince nepředstavují karotenoidy závažný problém, pokud je však jedinec ve stresu (nemoc, parazitace, podvýživa) pak pro něj vyšší dávka karotenoidů může znamenat nebezpečí. To podporuje výsledek McGraw a Klasing (2006), kteří zjistili negativní vliv podávání karotenoidů na imunitní reakce zjišťované jako míru oxidativního vzplanutí. Jedinec by se pak měl snažit vyhýbat potravě bohaté na karotenoidy, aby nezhoršoval svůj zdravotní stav.

Předpoklady této hypotézy:

1. Příjemcem signálu je preferováno maximální rozvinutí znaku.
2. Handicap způsobený štěpnými produkty karotenoidů je natolik silný, že může ovlivnit celou fyziologii jedince.

3. Frekvence prooxidačního štěpení karotenoidů je závislá na zásobách ostatních nebarevných antioxidantů.
4. Testosteron zlepšuje ornamentaci a zároveň zhoršuje oxidativní stav, snižuje zásoby nebarevných antioxidantů, a snižuje tak ochranu karotenoidů před štěpením. Vzniká tedy fyziologické trade-off.

Na základě hypotézy karotenoidního handicapu, byl proveden pokus s cílem zjistit vliv podávání potravy obohacené velkými dávkami karotenoidů zároveň s bakteriemi (dlouhodobý stres, díky nepřetržité stimulaci imunity) na barvu a velikost ornamentu a kondici jedince. Pokud by platila tato hypotéza, jedinci, jejichž imunitní systém bude stimulován podáváním bakterií, by měli mít horší oxidativní stav, současné podávání velkých množství karotenoidů pak může mít negativní vliv na zdraví jedince. Při těchto podmínkách se dle navržené hypotézy očekává snížení příjmu karotenoidů (zvíře se bude snažit vyhnout potravě bohaté na karotenoidy) a žádný nebo nepříznivý efekt podávání karotenoidů na rozvinutí ornamentu a na imunitu. Pokud předpokládáme synergistické působení antioxidantů, pak současné přidání například vitaminu E či C do potravy by mělo vést ke zlepšení antioxidační obrany organismu a zbarvení.

Imunologické parametry jako ukazatelé kondice jedince

Funkce imunitního systému je pro celkové zdraví jedince velice důležitá a jednotlivé parametry nám mohou o kondici jedince sdělit dostatek informace. Díky komplexitě imunitního systému se jednotlivé možné sledované parametry silně ovlivňují. Zvýšená přítomnost jednoho imunologického parametru, může souviset se sníženou přítomností jiného (Keil et al. 2001, Kramps et al. 2012), a proto je žádoucí sledovat více parametrů fungování imunitního systému, aby bylo možné si utvořit ucelený obrázek se silnější výpovědní hodnotou (např. Hůrak et al. 2000, Saino et al. 2003, Müller et al. 2004, Matson et al. 2005, Vinkler et al. 2010, Vinkler et al. 2012). Při studiu role imunokompetence v kondičně závislých trade-off předpokládáme, že imunitní funkce jsou energeticky (nebo metabolicky) nákladné (Demas et al. 1997, Lochmiller and Deerenberg 2000, Ots et al. 2001, Martin et al. 2002) a závislé na zdrojích (Saino et al. 1997, 2003, Alonso-Alvarez a Tella 2001) a můžou tak kompetovat s jinými energeticky náročnými aktivitami spojenými s kondicí jedince (růst, reprodukce, ornamentace). Karotenoidní ornamenty jako čestné signály kvality jedince můžou signalizovat imunokompetenci

jedince. Prostředí může ovlivnit imunitu přímou inhibicí imunitních buněk skrz toxiny z jídla, nebo nepřímou, kdy nadledvinky produkují kortikosteroidy, jejichž hladina souvisí se stresem (Diseases et al. 2012). Stres může být způsoben například hladověním (Good et al 1976). Imunitní faktory se také mohou lišit v závislosti na pohlaví (Cucco et al. 2007, Maney et al. 2008, Coster et al. 2011) a věku jedince (Costantini a Dell'Omo 2006, Vinkler et al. 2010) a roční době (u ptáků stěhování na zimoviště, období reprodukce).

Existují různé cesty ke zkoumání stavu imunitního systému jedince a jednou z nejvyužívanější z nich je stanovení základních hematologických hodnot. Buňky vyskytující se v krvi jsou jednak erytrocyty a jednak leukocyty. Počty těchto buněk mohou mít význam při stanovení infekčního stavu organismu a tím i odhadnutí zdraví a kondice jedince. Celkový vysoký počet leukocytů obecně signalizuje probíhající infekci (Ots et al. 1997, Fair et al. 2007). Na druhou stranu zvířata trpící podvýživou mají nižší počet leukocytů, který v tomto případě značí celkovou imunosupresi a náchylnost k infekci (Tavares-Dias et al. 2009). Vysoký počet leukocytů může znamenat, buď že jedinec je v dobré kondici a schopen bojovat s infekcí, nebo s ní naopak již bojuje (Source et al. 2006). Počet buněk nemusí nutně korelovat s jejich aktivitou (Ladics et al. 1998, Wilson et al. 2001). Absolutní počet leukocytů méně podléhá změnám v důsledku působení stresu (Delehanty a Boonstra 2009, Leonardi a Klempau 2003). V periferní krvi ptáků se vyskytuje 5 morfologicky odlišných typů leukocytů: lymfocyty, heterofily, basofily, eosinofily a monocyty (Lucas a Jamroz 1961). Fyziologické hodnoty se liší mezi druhy (Campbell a Ellis 2007) a také mezi jedinci chovanými v zajetí a volně žijícími (Ewenson et al. 2001). U většiny druhů ptáků jsou v dostatečné míře detekovány pouze heterofily a lymfocyty. Heterofily jsou fagocyticky aktivní buňky, které se jako první podílejí na reakci proti infekci. Několik studií dokumentuje, že poměr heterofilů a lymfocytů (dále jen H/L) může spolehlivě indikovat dlouhodobý stres (Lethey et al. 2003, Davis et al. 2008), stejně jako infekční stav u některých nemocí. Na rozdíl například od absolutního počtu leukocytů, který ukazuje spíše stresovou odpověď ihned po vzniku stresu (Davis 2005, Davis et al. 2008). Díky tomu se dá využít jako hlavní měřitelný parametr dlouhodobého zdraví, který ukazuje na životní podmínky jedince (Ardia et al. 2008). Mláďata lejsků černohlavých (*Ficedula hypoleuca*), která byla parazitována, nebo trpěla podvýživou, měla vyšší poměr H/L v krvi než zdravá a zároveň mláďata s nižším poměrem H/L v krvi měla vyšší návratnost na hnízdiště v dalších letech a tedy i lepší přežívání (Lobato et al. 2005). Zvýšený poměr H/L u dospělých jedinců sýkory koňadry (*Parus major*) byl pozorován

v odpovědi na experimentální zvýšení snůšky (Horak et al. 1998) a zároveň došlo k poklesu absolutního počtu leukocytů, nejspíš v souvislosti s imunosupresí kvůli zvýšenému reprodukčnímu úsilí. Při stimulaci humorální imunity pomocí imunizace byl sledován vyšší poměr HL (*Parus major*, Krams et al. 2012). Vyšší poměr H/L u mláďat může být ovšem také záležitostí fyziologická, nesouvisí s probíhajícím stresem (Dehnhard et al. 2011). Proto je nutné zohlednit při sledování hematologických parametrů jako ukazatelů kondice jedince jeho věk a pohlaví.

Určení dynamiky krevních buněk může být také hodnotný parametr pro posouzení kondice jedince. Životnost ptačích erytrocytů je poměrně krátká (28-48 dnů, Campbell a Ellis 2007) a je pravděpodobně dána rychlým metabolismem ptáků, souvisejících s náročností letu. Poměr imaturních ku dospělým erytrocytům se liší mezi druhy a může odhalit anemii při zvýšeném poměru (až 10% imaturních erytrocytů v krvi; Campbell a Ellis 2007). Zvýšený poměr těchto nedospělých stádií se vyskytuje u mláďat, a celkově umožňuje ptákům lépe snášet krevní ztráty (Campbell a Ellis 2007). Existují studie podporující potenciální význam tohoto znaku u divokých zvířat (Belskii et al. 2005, Carleton 2008). U dospělých jedinců hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) byl nalezen vyšší poměr imaturních erytrocytů u menších jedinců a u mláďat rostl tento poměr s růstem velikosti těla (Vinkler et al. 2010). To naznačuje, že se tento poměr liší s věkem a je možné, že předpovídá rychlost růstu u mláďat.

Dospělé erytrocyty ptáků na svůj povrch mohou vázat některé patogenní organismy a spolu s makrofágy a monocyty vytvářet těsné uskupení kolem parazita, které vede ke zvýšené fagocytické aktivitě (Passantino et al. 2007), díky čemuž fungují jako podpůrné buňky imunitního systému.

Jako další parametr aktivity a funkčnosti imunitního systému se dá využít i měření aktivity komplementu. Komplement je součástí vrozené imunity, která představuje první linii obrany před invadujícími mikroby. Nedostatek komplementových součástí je spojen s různými infekčními a neinfekčními nemocemi (lupus, arthritida), díky tomu se stalo jeho stanovení běžnou součástí praxe u lidí a domestikovaných zvířat (Matson et al. 2005). Hlavní funkcí komplementu je proděravění buněčných membrán bakterií a tím jejich usmrcení. Složky komplementu ale mimo jiné fungují také jako opsonizátory (označují bakterie k usnadnění fagocytozy; Ellis, 2001) a chemoaktraktanty (lákají k bakteriím složky získané imunitou; Kopecký a Krejsek, 2004) a propojují tak vrozenou a získanou složku imunity. Aktivita komplementu se stanovuje in vitro, pomocí smíchání séra (plasmy) s určitým kmenem bakterií E.coli a sleduje se doba, za kterou jsou bakterie

usmrceny (Buchtková et al. 2011). Ta je vyjádřena jako čas v hodinách potřebný k zabití 50% bakterií *E.coli* (Buchtková et al. 2011). Kratší čas tedy reprezentuje vyšší (lepší) komplementovou aktivitu v plasmě. Aktivita komplementu byla měřena u vlhověce (*Molothrus ater*), jako odpovídavost na stresové podněty a bylo zjištěno, že schopnost zabíjet bakterie se vlivem stresu snižuje pouze u samců (Merill et al. 2012). Schopnost jedince rychleji usmrtit nepřátelské mikroorganismy, ukazuje na celkovou účinnější funkci imunitního systému, může tedy ukazovat na lepší kondici jedince a jeho vztah k ornamentaci je proto nasnadě. Podle mě dostupných informací, nebyla aktivita komplementu dosud studována jako parametr imunitního systému v souvislosti s ornamentací a signalizací kvality jedince. Pouze u kura bankivského (*Gallus gallus*), byly podávány karotenoidy, které ovšem neměly žádný efekt na barvu znaků (nejspíš melaninové), u samců byla jejich zvýšená hladina spojená se zvýšenou aktivitou komplementu, ale zároveň snížilo schopnost fagocytovat bakterie (McGraw a Klasing 2006).

Experimentální ověření funkce imunitního systému se provádí jeho stimulací pomocí různých antigenních a mitogenních látek. Běžně používaným parametrem v ekologických studiích je měření otoku po stimulaci mitogenem PHA (phytohemagglutinin; Kennedy a Nager 2006). Princip této metody spočívá v injekci PHA (rozpuštěného v PBS, tj. phosphate buffer saline) do patagia (blána křídla) sledovaného jedince, který způsobí v tomto místě aktivaci T lymfocytů a vyvolá lokální zánětlivou odpověď (Goto et al. 1978). Na tomto místě se po čase objeví otok, který lze měřit pomocí digitálního měřítka. Tato metoda nevyvolává u ptáků zátěž a proto je považována za šetrnou (Merino et al. 1999). Metoda je ovšem citlivá na manipulační stres (Horak et al. 1998). Původně se měřil otok po 24 hodinách (Navarro et al. 2003), ale držet takovou dobu ptáka při terénních studiích je občas nemožné, proto se doba po měření otoku u některých studiích zkrátila na 6h (Moller et al. 2003, Vinkler et al. 2010). Otoková reakce se liší i v závislosti na denní době, proto se doporučuje podávat PHA všem sledovaným jedincům přibližně ve stejnou denní dobu (Navarro et al. 2003). Ve většině studií používajících tuto metodu byl větší otok spojován s lepší funkčností imunity a signalizací imunokompetence (Blount 2003, McGraw a Ardia 2003, Peters 2004, Mougeot 2008, Perez-Rodriguez et al. 2008). Injekce PHA má za následek infiltraci buněk (Martin et al., 2006, Vinkler et al. 2012), které při stimulaci produkují reaktivní N a O radikály (Koner et al., 1997, Nathan and Shiloh, 2000, Coleman, 2001) a může se tak zhoršovat oxidativní stav organismu (Costantini a Dell’Omo, 2006, Hřák et al., 2007), což může souviset s dostupností

karotenoidů pro ornament. Byl potvrzen vliv stimulace imunity pomocí PHA na snížení množství karotenoidů v plasmě, ale ne na množství ostatních antioxidačních rezerv (Perez-Rodriguez et al. 2008). Samci tetřívků s červenějším ornamentem a orebice s jasnějším ornamentem měli větší otok (Mougeot et al. 2008, Perez-Rodriguez et al. 2008, Perez-Rodriguez et al. 2010) a také nižší oxidativní poškození lipidů (Perez-Rodriguez et al. 2010). Protože PHA není antigen, ale pouze mitogen (Davis a Morini 1993) a vyvolává spíše lokální než systémovou imunitní odpověď, mělo by ukazovat spíše na množství dostupných imunitních buněk v okolí místa injekce (Vinkler et al. 2010). Proto může větší otok znamenat buď lepší připravenost organismu bojovat s patogenem, nebo již probíhající infekci, která zapříčinila větší počet dostupných lymfocytů (Saks et al. 2004). Podle některých výsledků souvisí otok po PHA pozitivně se zbarvením karotenoidního ornamentu (Perez-Rodriguez et al. 2008) či množstvím karotenoidů v plasmě (McGraw and Ardia, 2007). U hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) bylo zjištěno, že otok po PHA závisel na aktivitě basofilů (první buňky, které infiltrují místo zánětu) a zároveň byl pozorován negativní vztah mezi sytostí barvy (saturation) karotenoidního ornamentu a velikostí otoku po aplikaci PHA (Vinkler et al. 2012). Což naznačuje, že jedinci v horší kondici exprimovali méně sytý ornament a dávali tak najevo svou kondici. Ke stanovení odpovídacího organismu na imunitní stimulaci se používá také aktivace imunity pomocí SRBC (sheep red blood cells), kdy se 9 dní po aplikaci stanoví hladina protilátek v krvi. Toto je již skutečný antigen, pomocí kterého se měří aktivita humorální imunity (Bacon, 1992; Higgins, 1996). Tento znak koreluje s resistencí některým parazitům (Parmentier et al. 1996).

Na rozdíl od spíše lokální stimulace imunitního systému pomocí PHA se používá v mnoha studiích i celková stimulace pomocí LPS (lipopolysacharid), což je hlavní složka vnější membrány Gram negativních bakterií, a je využívána pro svou schopnost aktivovat imunitní funkce. Intraperitoneální podání LPS, které zvyšuje zánětlivou odpověď organismu, snižuje hodnoty karotenoidů v plasmě (Koutsos et al. 2003) a celkové plato příjmu karotenoidů bylo nižší, ačkoli jejich příjem potravou byl dostačující (Alonso Alvarez et al. 2004). Podávání LPS snižuje i barvu ornamentu (Alonso Alvarez et al. 2004). To může souviset s tím, že imunitní odpověď je spojena s produkcí volných radikálů, které ovlivňují hladinu karotenoidů v krvi pro ornament.

Výsledky ze stimulace imunitní odpovědi pomocí PHA i LPS naznačují, že při stresu jsou karotenoidy odstraňovány z oběhu.

1.3. *Role karotenoidních ornamentů v pohlavním výběru*

Jak již bylo řečeno výše, karotenoidní ornamenty jsou často popisovány jako čestné signály kvality, které se uplatňují při výběru partnera či kompetici (Olson & Owens, 1998). Vybíravějším pohlavím jsou obvykle samice a samci jsou tak vystaveni intenzivnějšímu pohlavnímu výběru a tedy právě u nich se vyvíjejí nápadnější sekundární pohlavní znaky. Samice musí dobře rozlišovat v kvalitě samců, se kterými se budou rozmnožovat, protože nemohou zvýšit počet potomků častějšími kopulacemi (Andersson & Iwasa 1996).

Barevnější a kvalitnější samec může samici na hnízdě nosit více potravy (Hill 1991) a ta pak může mít větší snůšku (Nager et al. 1997). Tento typ výhod se uplatňuje u dlouhodobých svazků (Price a kol. 1993). Pokud se v rámci druhu neudržují rodičovské páry v průběhu celého roku, nebo pokud samec hnízdí poprvé, nemůže samice ohodnotit jeho rodičovské investice v předchozích letech a potřebuje využít jiný znak, který by jí ukázal možnosti svého partnera. Mnoho studií je zaměřeno na objasnění znaků, které jsou pro samici ve výběru rozhodující (Kingma et al. 2008, Alonso et al. 2010, Griggio et al. 2011, Simon a Verhulst 2011). Lépe ornamentovaný samec bude pravděpodobně starší a zkušenější rodič (Kokko a Lindstrom 1996). Pokud lépe zbarvený samec obhájí lepší teritorium, výběrem takového samce získá samice i lepší teritorium (Folstad et al. 1992, Wolfenbarger 1999). Vztah mezi ornamenty a kvalitou teritoria, ale může být udržován i intenzivní samčí kompeticí. V takovém případě může být barva ornamentu signálem dominance při obraně teritoria a samice si mohou vybírat partnery dle jiného znaku (Pryke et al. 2001). Kompetice byla v některých studiích v souvislosti s karotenoidními ornamenty prokázána (McGraw a Hill 2000, Pryke et al. 2001, Pryke a Andersson 2003).

Barevnější karotenoidní ornament může signalizovat například dobrý stav imunitního systému, nebo lepší obranu proti parazitům (Blount et al. 2003, Hamilton a Zuk 1982). Existují ovšem i ornamenty, které mohou odrážet aktuální stav jedince, jako například zobák (Faivre et al. 2003, Omland 1996, Peters et al. 2004, Murphy et al. 2009), nebo kožní výrůstky kurů (Zuk 1996) a tetřívků (Mougeot 2007).

Samci s barevnějším ornamentem mají větší šanci na přilákání samice, mohou tedy začít hnízdit dříve a mít vyšší pářící úspěch (Hill et al. 1999, McGraw et al. 2001 Møller 1988; Møller 1990; McGraw et al. 2001; Kleven et al. 2006, Wolfenbarger 1999). Velké množství studií souvislosti kondice a karotenoidního ornamentu bylo provedeno na hýlovi rudoprsém (*Carpodacus mexicanus*). Z výsledků korelativních studií tohoto druhu

vyplývá, že samice preferují samce s barevnějším (Hill 1990; DeKogel a Prijs 1996, Karubian 2002), nebo větším ornamentem (Hill et al 1999), což podporuje myšlenku, že karotenoidní ornamenty jsou využívány samicemi k výběru partnera. Pokud si měly vybrat mezi velikostí a barvou, pak vybíraly spíše malý, ale jasně zbarvený znak než velký a bledý (Hill 1994, 1991). Při experimentálním ověřování pomocí barvení ornamentu si samice opět vybíraly samce s barevnějším znakem (Hill 1990, Burley et al. 1987). Při podávání karotenoidů vznikl červenější ornament, který byl opět preferován samicemi (Blount et al. 2003, Hill 1990, Hill 1991, Hill 1992). Je zajímavé, že jedinci z volné přírody a jedinci odchovaní, při stejné dávce karotenoidů exprimovali stejný znak (Hill 1992).

Ve studiích s karotenoidními ornamenty se často vyskytuje přítomnost signálu v UV oblasti. Protože mají ptáci tetrachromatické vidění (Hart 2001), může tento signál také ovlivňovat výběr partnera. Předmětem samičího výběru je u kachen divokých (*Anas platyrhynchos*) také karotenoidní znak – zobák. Ten vykazuje právě takový UV signál, jehož hodnota je snížena během párování a souvisí s imunitní odpovědí (Peters et al. 2004). Během období reprodukce ovšem jedinci často maximalizují ornamentaci a karotenoidní pigmenty tak mohou překrýt signál UV, který může být způsoben pouze odrazivostí samotného integumentu. Přítomnost UV signálu u karotenoidních ornamentů zaznamenal i Mougeot et al. (2008) u tetřívky (*L. lagopus scoticus*, červený karotenoidní hřebínek nad okem) a potvrdil negativní souvislost mezi signálem v červené oblasti a UV. UV odrazivost karotenoidního ornamentu se zdá být ovlivněna stavem integumentu a frekvencí čištění a promazávání peří (Perez-Rodriguez et al. 2011).

Zajímavá je přítomnost melaninových i karotenoidních znaků u jednoho druhu, o té již bylo psáno výše. Oba tyto znaky exprimuje například lesňáček žlutohrdlý (*Geothlypis trichas*, Dunn et al. 2010), u kterého by velikost melaninového ornamentu měla být určující v pohlavním výběru, ale v této studii zjistili spíše výběr závislý na velikosti a barvě karotenoidního ornamentu. Studovali dvě populace tohoto druhu, u jedné souvisela humorální imunita s karotenoidním ornamentem a u druhé s melaninovým. Přitom se nelišili v parazitaci, ani hladině karotenoidů v plazmě. Stejný aspekt kvality tak může být u každé populace stejného druhu vybírán spojen s jiným ornamentem, ale celkově ukazují ornamenty na kondici jedinců. Opačné výsledky byly zjištěny například u sýkory koňadry (*Parus major*, Senar et al. 2003), melaninový ornament zde nekoreloval s nutričním stavem (ptilochronologie), koreloval pouze s karotenoidním znakem, podporuje tak spíše myšlenku oddělené signalizace jednotlivých znaků. Rozdílné výsledky studií jsou však

způsobeny také nekonzistentním použitím metod a nedostatečným vysvětlením termínu kondice (Hill 2011).

1.4. *Koroptev polní (Perdix perdix)*

Modelovým druhem je v této práci koroptev polní (*Perdix perdix*, Linnaeus, 1758), která se taxonomicky řadí do řádu hrabavých (Galliformes), čeledi bažantovitých (Phasianidae), podčeledi koroptve (Perdicinae). Koroptev polní je pták živící se převážně rostlinnou potravou, občas doplněnou hmyzem (zvláště mláďata). Váží kolem 400 g, má zavalité tělo, krátký ocas, a zakulacená křídla. Tělo je zbarveno přechody šedé a hnědé barvy, mláďata jsou zbarvena do hněda bez výrazných ornamentů (Svensson a kol. 2010, Dahlgren 1990). Jedinci obou pohlaví, především samci, mají na hrudi nápadný tmavě hnědý péřový ornament ve tvaru podkovy (dále jen podkova), u samic a mladých samců je tento ornament menší nebo dokonce chybí. Dále mají jak samci, tak i samice výrazný červeno-oranžový kožní proužek za okem.

Přirozeným životním prostředím tohoto druhu jsou remízky na polích (Meriggi et al. 1991, Rantanen et al. 2010). Na populaci tohoto druhu v ČR měla proto vliv kolektivizace zemědělství v 50. letech (Hudec et al. 2005), kdy byl druh vyhoštěn ze svého přirozeného prostředí a stal se ohroženým druhem (Česká společnost ornitologická, www.cso.cz). Dodnes se vyskytují téměř na celém území ČR, jejich populace jsou však malé a vyskytují se často na rumišťích, ale i na polích a loukách s hustou vegetací.

Koroptev polní je nemigrující, krátkověký, sociálně monogamní pták, který po dobu rozmnožování zůstává v páru, a o mláďata pečují oba rodiče (Jenkins 1961). Koroptve zřizují a hájí své reprodukční teritorium až po vytvoření páru na začátku jara (Blank & Ash 1956). Samice si vybírá samce na základě pozorovaných fenotypových a behaviorálních projevů samce, dochází i k bojům o partnery v rámci obou pohlaví. Hnízdní sezona je od dubna do července (Hudec et al. 2005) a hnízdo si staví na zemi v husté vegetaci (důlek vystlaný trávou). Po skončení hnízdění se koroptve sdružují do hejn čítajících kolem 10-20 jedinců (rodiče s mláďaty, ale i nepříbuzní jedinci), ve kterých přečkávají zimu. Na jaře se začínají utvářet páry pro nastávající období rozmnožování. Vytvořený pár následně opouští hejnko (Dahlgren 1990).

Koroptev má dva výrazné ornamenty potenciálně využitelné v pohlavním výběru. Podkova na hrudi je zbarvena melaninem a je péřová, zatímco ornament za okem je kožní

a jeho barva může být způsobena prokrvením dané oblasti, nebo pigmenty - melaniny, karotenoidy, a jinými barvivy, nebo jejich kombinacemi. Pro nás jsou potenciálně zajímavé karotenoidy, neboť je jedinec musí získávat z potravy a mohou mít i jiné funkce v organismu (viz výše) a mohou tak vytvářet trade-off mezi jejich deposicí do ornamentu a jiným fyziologickým využitím. Navíc je tento ornament kožní a může tedy signalisovat aktuální změny kondice jedince na rozdíl od peří, které se mění jen jednou za rok při přepelichání. Mohl by tedy příjemci signálu podávat jinou informaci o kvalitě a kondici jedince než pérové ornamenty.

1.5. Cíle práce:

Tato diplomová práce je součástí projektu GAČR (č. 206/08/1281), který se zaměřuje na pochopení mechanismu párování u koroptve polní.

Práce se snaží odpovědět na 4 otázky:

- 1) Jestli je červeno- oranžový proužek za okem pigmentován karotenoidy
- 2) Jaký je vztah mezi vybranými ornamenty koroptve polní (proužek za okem a melaninová podkova na hrudi) a kondicí jedince?
- 3) Jsou tyto ornamenty využívány při výběru partnera? A souvisí ornamenty s přežíváním jedinců?
- 4) Test hypotézy signalizace kondice pomocí ornamentů („Carotenoid maintenance hypothesis“) – Má podávání karotenoidů při současné stimulaci imunity vliv na expresi kožního ornamentu za okem?

Jednotlivé cíle práce tedy jsou:

- a) Ověřit, zda je pigmentovaný kožní proužek za okem zbarven karotenoidy.
- b) Zjistit, zda spolu souvisí exprese melaninového a karotenoidního ornamentu.
- c) Zjistit, zda ornamenty koroptve polní souvisí s kondicí a co ornament říká příjemci signálu.
- d) Ověřit roli těchto ornamentů v pohlavním výběru, zda jsou jedinci s výraznějším ornamentem preferováni při výběru partnera.
- e) Ověřit zda ornament může být ukazatelem přežívání.
- f) Pokusně ověřit, jaký vliv má podávání karotenoidů za přítomnosti stresu na expresi ornamentu, jako ukazatele kondice.

2. Metodika

2.1. Divoká populace

2.1.1. Sběr vzorků a dat

Sledování a měření divoké populace koroptve polní proběhlo v letech 2009 a 2010. Jedinci byli v obou letech odchyceni v okolí vesnice Milešín (Vysočina, ČR, Loc: 49°22'6.23"N, 16°12'4.715"E) na přelomu února a března (těsně před začátkem párování, Jenkins 1961), místními myslivci MS Borovina-Vidonín. V obou letech byli ptáci komorováni měsíc před vlastním měřením a vypuštěni do přírody, kdy měli přístup k vodě a jídlu ad libitum.

Po přinesení do improvizované laboratoře, kde byla prováděna měření a odběry vzorků, byli jedinci označeni standardními kovovými kroužky z České kroužkovací stanice (Národní Museum Praha) a byly zaznamenány údaje o věku a pohlaví.

Z žíly na pravém křídle byl odebrán vzorek krve, kapka byla použita na krevní nátěr, 15 µl krve bylo kápnuto do 2985 µl Natt-Harickova roztoku (složení Campbell a Ellis 2007) a uloženo do chladničky, pro následné zjištění absolutního počtu buněk. Zbytek krve byl centrifugován k oddělení plasmy a krvinek, plasma byla ihned umístěna do tekutého dusíku a poté do -80°C, sediment krvinek byl promíchán s lihem a uložen do -20°C.

Pro změření plochy karotenoidního proužku za okem a melaninového ornamentu na hrudi (tzv. podkova) byli ptáci oskenováni na scanneru (Perfection V10 scanner, Seiko Epson Corporation, Nagano, Japan) v prostředí temného stanu (konstrukce 50x50x100 cm, potažená černou tkaninou). Temný stan zaručil stejné světelné podmínky všech naskenovaných obrázků. Každý ornament byl naskenován dvakrát. Na ploše scanneru byl přiložen barevný standard s měřítkem (šedý standard GC 18 a barevná tabulka Q 14; Danes-Picta, Praha, ČR). V temném stanu jim byla také změřena odrazivost karotenoidního proužku pomocí spektrometru Avantes Avaspec 2048 se světelným zdrojem Avalight XE (Avantes BV, Eerbeek, The Netherlands), ze které se následně počítaly hodnoty barvy ornamentu. Měření bylo relativní, vztažené k tmavému standardu s minimální odrazivostí a k bílému standardu (WS-2), které byly načteny před každým používáním spektrometru. Sonda spektrometru (průměr 2 mm) byla přiložena kolmo na tři místa ornamentu na obou stranách hlavy.

Poté byl proveden test kožní otokové reakce na PHA (Cucco et al. 2006, Smits et al. 1999, Vinkler et al. 2010). Jedincům byla pomocí digitálního mikrometru (s přesností 0,01

mm; Mitutoyo 7301, Mitutoyo Corporation, Kanagawa, Japan) 3x změřena tloušťka středu patagia levého křídla (dále jen patagium) a zde byl do podkoží aplikován 1 mg mitogenu PHA rozpuštěného ve 40 μ l PBS (L8754 a D5652, Sigma-Aldrich, USA). Ptáci byli odneseni zpět do komor a po 6 hodinách klidu jim byla změřena tloušťka otoku patagia v místě vpichu (6 hodin - Bonato et al. 2009, Møller et al. 2003, Vinkler et al. 2010). Odpověď organismu na PHA byla následně stanovena jako průměrná tloušťka patagia po 6 hodinách působení PHA minus průměrná tloušťka patagia před aplikací PHA.

Nakonec byla změřena délka pravého běháku (dále jen tarsu) pomocí digitální šuplery (mm, s přesností 0,01mm, Kinex, CR) a pták byl zvážen pomocí pružinové váhy (g, s přesností 0,05g Pesola, Switzerland). Hmotnost byla později vydělena délkou tarsu a tato standardizovaná hmotnost byla použita pro pozdější analýzy jako indikátor kondice. Měření jednotlivých veličin bylo prováděno vždy pouze jedním člověkem, aby nedošlo ke zkreslení dat rozdílnou chybou měření.

Měření námi sledovaných znaků proběhlo v roce 2009 13. a 14.3. Ihned po změření byl ptákům instalován vysílač (TW-4, Biotrack, UK) a ti pak byli po skupinkách vypouštěni zpět do přírody na lokalitě odchyty. To samé proběhlo i u ptáků v roce 2010, zde měření a vypuštění proběhlo 10.3. Žádná koroptev neuhynula během komorování či manipulace.

Od vypuštění označených koroptví byla pomocí telemetrování zaznamenávána pro každého jedince každý den jedna lokace výskytu, od začátku inkubace snůšek byli označení ptáci zaměřováni méně často (2-5 lokací na jedince za týden) a od poloviny srpna až do konce roku probíhalo zaměřování 1x týdně. Zaměřování koroptve polní měla na starost Dana Rymešová z ČZU.

2.1.2. Analýza dat

2.1.2.1. Charakteristiky ornamentů

Parametry barvy karotenoidního proužku byly spočteny z křivek vytvořených spektrometrem. Ty byly nejprve převedeny do tabulek v rozmezí 400-700nm (interval 1 nm) pomocí programu AvaSoft 7.6 a s tabulkami se dále pracovalo v programu MS Excel při počítání jednotlivých vybraných parametrů.

Ze 6 měření (3 pro ornament na levé a 3 pro ornament na pravé straně) byly spočítány průměrné odrazivosti v jednotlivých intervalech vlnových délek a z těchto průměrných hodnot pak byly spočítány jednotlivé komponenty barvy. Hodnoty jednotlivých parametrů byly vypočítány podle článku Saks et al. (2003), kteří vycházeli z Endler (1990) při analýze barvy karotenoidních ornamentů peří u zvonka zeleného (*Carduelis tristis*).

Hue (barva ornamentu) může být chápána jako označení barvy (žlutá, zelená, červená), koreluje s tvarem reflektanční křivky, je měřeno ve stupních kolem kruhového spektra barev. Chroma je parametr čistoty, nebo saturace barvy, ukazuje, jak rychle se mění intenzita odrazivosti s vlnovou délkou – je funkcí strmosti křivky. Brightness je zde definována jako celkové množství (intenzita) světla odražené od měřeného povrchu.

Hodnoty byly spočteny dle následujících vzorců:

$$H = \arctan \left[\frac{(Q_y - Q_b)/Q_t}{(Q_r - Q_g)/Q_t} \right]$$

$$C = \sqrt{(Q_r - Q_g)^2 + (Q_y - Q_b)^2}$$

$$B = \sum_{\lambda=400}^{\lambda=700} Ri$$

Kde:

Qt ... součet reflektancí v celém sledovaném spektru (v rozsahu 400 – 700 nm)

Qb ... součet reflektancí v modré části spektra (400 – 475 nm)

Qg ... součet reflektancí v zelené části spektra (475 – 550 nm)

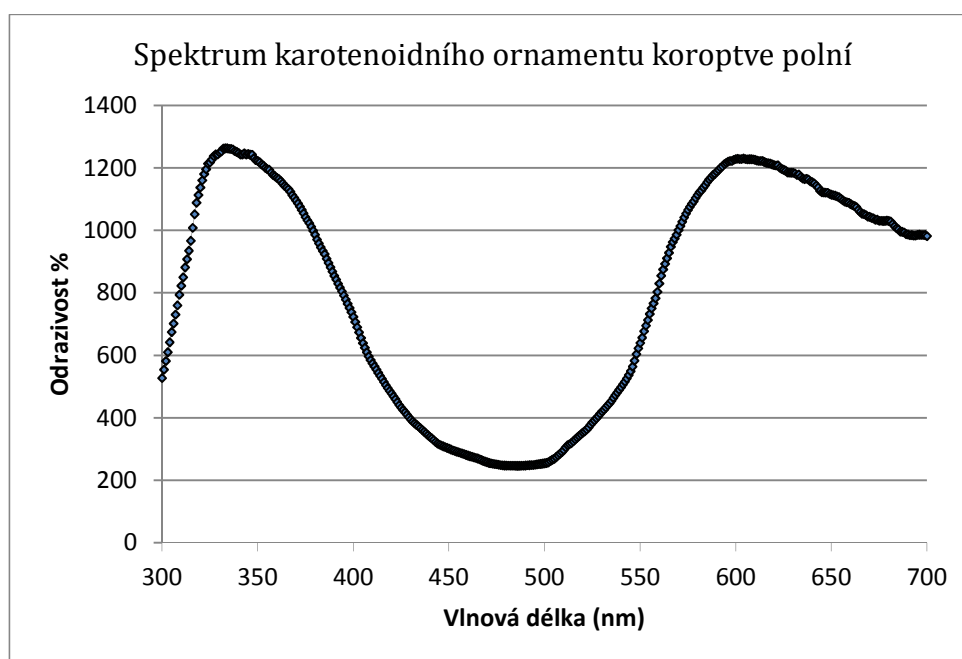
Qy ... součet reflektancí ve žluté části spektra (550 – 625 nm)

Qr ... součet reflektancí v červené části spektra (625 – 700 nm)

Ri ... odrazivost (reflektance) v dané vlnové délce

Spektrum odrazivosti karotenoidního proužku změřené na spektrometru bylo bimodální s jedním vrcholem v červené oblasti 600-700nm a druhým v UV oblasti (300-400nm, Obrázek 1) podobně jako zjistil Mougeot et al. (2007) u karotenoidy pigmentovaného kožního ornamentálního hřebínku bělokura skotského (*L. lagopus scotica*), u kterého následně spočítal 5 parametrů barvy ze spektrálních křivek (300-700 nm), zabýval se významem odrazivosti ornamentu v UV spektru (300-400 nm).

Obrázek 1. Typické sledované spektrum odrazivosti karotenoidního ornamentu.



Vzhledem k tomu, že naše křivky vykazovaly také jedno maximum v dané UV oblasti, byly spočteny dané parametry pro UV a červenou oblast dle Mougeot et al. (2007). Odrazivost v UV oblasti silně negativně korelovala s odrazivostí v červené oblasti ($r = -0.837$, $p < 0.001$). V současnosti ovšem není jisté, jaký signální význam reflektance v UV oblasti má – je možné, že nižší obsah pigmentu ve tkáni, který má za následek světlejší (oranžovější) barvu proužku, nezakrývá dostatečně přirozenou UV odrazivost kůže. Navíc není zřejmé, na které vlnové délky jsou citlivé UV čípky v očích koroptve. Podle ostatních druhů z řádu hrabavých (Hart 2001) se zdá, že koroptev vnímá UV spíše v delších

vlnových délkách (cca 420nm; Hart 2001) a je tedy pravděpodobné, že dané maximum v UV oblasti je pouhý artefakt odrazivosti kůže. Proto jsme se rozhodli dále s parametry UV nepočítat.

Protože brightness byla v obou postupech počítána shodně (jako suma reflektancí všech vlnových délek), a tyto dvě hodnoty velmi silně pozitivně korelovaly ($r = 0.971$, $p < 0.001$), byla pro další analýzy použita pouze jedna hodnota brightness počítaná podle Saks et al. (2003). Pro konečné analýzy jsme tedy nakonec využili jen parametry HCB (Endler 1990) a red chroma (Mougeot et al. 2007), protože je pro nás potenciálně zajímavá hlavně červená oblast spektra. Z těchto 4 parametrů byly následně pomocí PCA spočítány dvě veličiny (označené dále jako PC1 a PC2), které byly použity pro analýzy (Tabulka 2 a 3).

Velikosti obou ornamentů byly vypočteny z naskenovaných obrázků v programu Adobe Photoshop CS3 Extended verze 10.0 (1990-2007, Adobe Systems Inc., San Jose, California). Scany byly standardizovány barevně podle přiloženého naskenovaného standardu (Image -> Adjustments -> Levels; bílá, šedá a černá) a měřítka (funkce Ruler tool, 1cm = 75 pixelů). Samotná plocha ornamentu byla ohraničena pomocí funkce Magic wand tool na základě kontrastu barev. Program následně spočetl vybranou plochu ornamentu pomocí příkazu Record measurements.

2.1.2.2. Imunologické parametry

Bezprostředně po odběru krve byla první kapka použita k vytvoření krevního nátěru. Ten se nechal zaschnout na vzduchu. V laboratoři byly tyto nátěry následně obarveny barvením podle Pappenheima: 3 min. barvení v koncentrovaném činidle May-Grünwald (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA), 2 min. barvení ve zředěném činidle May-Grünwald v poměru 1:1 s destilovanou vodou, 15 min. barvení v činidle Giemsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ředěném v poměru 1:40 s destilovanou vodou, omytí destilovanou vodou a usušení nátěru. Všechny nátěry byly poté vyšetřeny na mikroskopu Olympus CX-31 (Olympus, Tokyo, Japan) při zvětšení 1000 x. Byla počítána frekvence heterofilů a lymfocytů (jako nejpočetněji zastoupených leukocytů v ptačí krvi) ve vzorku 100 leukocytů na sklíčku, a následně jejich poměr (počet heterofilů ku počtu lymfocytů, dále jen H/L), jako indikátor zdraví a dlouhodobého stresu (Davis et al. 2005, 2008). Jednotlivé

typy leukocytů byly určeny podle publikací Lucas and Jamroz (1961) a Campbell and Ellis (2007).

Dále byl z nátěru počítán poměr imaturních ku dospělým erytrocytům, jako indikátor rychlosti krvetvorby (Vinkler et al. 2010). Z každého nátěru byly vytvořeny digitální snímky pěti náhodně vybraných míst pod imerzním objektivem se 100x zvětšením (fotoaparát Olympus E-410). Na těchto místech buňky ležely vždy v jedné vrstvě a nepřekrývaly se, celkem tak bylo zachyceno přibližně 1000-2000 erytrocytů na jedince. Fotografie byly převedeny do černobílého formátu (1 bit, rozlišení 80 dpi) v programu Corel PHOTO-PAINT X3 software (Corel, Ottawa, Canada), tím se zajistila viditelnost pouze jader. Pokud bylo třeba, sousední jádra byla oddělena manuálně a případné nečistoty byly vymazány. Z těchto upravených snímků byl automaticky spočten celkový počet erytrocytů pomocí funkce Analyse particles v softwaru Image J (Rasband W.S. ImageJ; U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2008). Ve stejném programu pak byly na původních snímcích manuálně identifikovány a spočítány všechny imaturní erytrocyty (identifikace dle Lucas a Jamroz, 1961). Nakonec byl stanoven poměr počtu imaturních ku počtu dospělých erytrocytů.

Absolutní počet leukocytů a erytrocytů na jednotku krve byl stanoven v Bürkerově počítací komůrce jako počet buněk na daný objem komůrky vynásobený ředěním vzorku. Cca. 20 μ l suspenze (krev v Natt-Herrickově roztoku) bylo napipetováno mezi počítací komůrku a krycí sklíčko, umístěno na pracovní stolek mikroskopu (Olympus CX-31) a počkalo se na ustálení. Při zvětšení 100x bylo prohlédnuto 100 velkých čtverců na zjištění počtu leukocytů (objem 0,004mm³) a 20 obdélníků na erytrocyty (objem 0,001mm³). Zjištěný počet buněk byl vynásoben objemem počítané oblasti a ředěním vzorku.

Vzorky plasmy byly využity pro analýzu komplementové aktivity u populace divokých koroptví. Toto vyšetření bylo provedeno v laboratoři Dr. Hyršla, PřF Masarykovy univerzity v Brně. Aktivita komplementu byla měřena jako celková bakteriolytická aktivita pomocí bioluminiscenční metody. Při ní se využívá schopnosti komplementu v séru či krevní plasmě lyzovat Gram negativní bakterie. Pro analýzu byla použita bakteriální kultura E.coli K12, jejíž plasmid je obohacen o gen pro enzym luciferázu. Bakterie tak emitují bioluminiscenční světlo, které je zachyceno přístrojem (luminometrem). Získaná data jsou graficky znázorněna jako závislost životaschopnosti bakterií na koncentraci séra a z něj se odečte hodnota, která odpovídá koncentraci séra

potřebného pro usmrcení poloviny bakterií. Aktivita komplementu je tedy vyjádřena jako čas potřebný k zabití 50% bakterií. Ke stanovení aktivity komplementu bylo použito 40 μ l plasmy + 10 μ l HIS (inaktivovaného séra) + 50 μ l bakterii E. coli. Jako standard se používalo 50 μ l HIS + 50 μ l bakterií.

2.1.2.3. Ověření přítomnosti karotenoidů

Pro ověření přítomnosti karotenoidů v proužku za okem jsme použili samce koroptve polní z odchovny drůbeže v Jinačovicích. Samec byl usmrcen cervikální dislokací. Poté mu byl pečlivě odstraněn ornament za okem z levé i pravé strany, omyt destilovanou vodou, vložen do zkumavky a uložen do tekutého dusíku a následně do - 80°C. V laboratoři byl ornament následně rozdrcen v třecí misce a vložen do skleněné šroubovací 14 ml zkumavky. Rozmělněná tkáň byla zalita 4 ml tert-butyl-methyletheru (TBME, Sigma–Aldrich, USA) a zkumavka byla vložena do ultrazvukové vodní lázně na 1 min. Potom byly přidány 4 ml ultračisté vody, vzorek byl promíchán na vortexu a centrifugován po dobu 5 min při 400 RPM. Po centrifugaci byla pečlivě odpipetována vrchní vrstva obsahující TBME a v něm rozpuštěné pigmenty (obsahující potenciální karotenoidy) a ke zbytku vodní fáze byl přidán TBME a celý postup se ještě dvakrát opakoval, kvůli vyextrahování co největšího množství pigmentů. Nasbíraný vzorek byl vysušen při 40°C pomocí proudu dusíku a následně rozpuštěn v 50 μ l směsi methanol:acetonitril (1:1), vzniklý roztok byl napipetován do viálky pro analýzu HPLC. Ta byla provedena na fázové koloně Develosil C30 reverse (RPAqueous C30, 4.6 x 25 mm, Nomura Chemical, Japan) naplněné sorbentem C30. Jako mobilní fáze byla použita směs methanol (MeOH) : acetonitril (MeCN) pro vytvoření gradientu vymývání začínající 30% MeCN, po 30 min 45% MeCN, po dalších 10 min 100% MeCN a nakonec 10 min na uvedení do rovnováhy pomocí iniciálního 30% MeCN. Přítomnost karotenoidů byla zjištěna srovnáním retenčních časů a absorpčních spekter našeho vzorku se standardem luteinu a β -karotenu (X6250 a C4582, oba Sigma-Aldrich) a tabulkovými hodnotami retenčních časů karotenoidů.

Extrakce karotenoidů a HPLC analýza byla provedena v Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. za spolupráce a dohledu Dr. Petra Maršíka.

2.2. *Vliv suplementace na expresi ornamentu – experimentální design*

Při plánování experimentu jsme vycházeli z nově navržené hypotézy Carotenoid maintenance handicap (CMH), která na rozdíl od předchozích teorií antioxidační funkce karotenoidů tvrdí, že karotenoidy skutečnou antioxidační funkci nemají a jsou pouze náchylné k oxidaci, při které vznikají zdraví škodlivé štěpné produkty (Vinkler a Albrecht 2009). Ve vysokých dávkách mohou být karotenoidy spíše škodlivé, proto jsme pracovali s vysokými dávkami karotenoidů, mimo biologické optimum. Pokud je jedinec v dobrém zdravotním stavu, karotenoidy jsou využity pro ornamentaci, jedince tak produkuje červenější ornament a signalizuje tak dobrý zdravotní stav. Pokud je ovšem jedinec ve stresu (například nemoc), karotenoidy jsou štěpeny při oxidačním stresu a nemohou být využity pro ornament, jeho barva tedy bledne. Pro zdravé jedince by karotenoidy neměly představovat závažný problém, pokud je však jedinec vystaven stresu (parazitace, stres), pak pro něj vyšší dávka karotenoidů může znamenat nebezpečí. Jedinec by se pak měl snažit vyhýbat potravě bohaté na karotenoidy, aby nezhoršoval svůj zdravotní stav. Cílem experimentu bylo sledování vlivu podávání velkých dávek karotenoidů zároveň s bakteriemi (dlouhodobý stres, díky nepřetržité stimulaci imunity) na barvu a velikost ornamentu a kondici jedince. Z hlediska CMH se jedná o extrémní zátěž organismu.

K experimentu jsme použili 50 mladých samců ve stáří jednoho roku, kteří pocházeli z odchovny drůbeže v Jinačovicích (VFU, Fakulta veterinární hygieny a ekologie v Brně), kde pokus zároveň probíhal. Jedinci byli umístěni jednotlivě do klecí (š:89 × d:189 x v:40 cm). Aklimatizace proběhla 3 dny před začátkem pokusu, kdy byli jedinci krmeni ad libitum a zvykali si na umělý denní cyklus 12 hodin světlo a 12 hodin tma, který byl udržován v průběhu experimentu.

Měření před experimentem bylo provedeno 17. 4. 2009. Každému jedinci bylo odebráno 100μl krve z pravé brachiální žíly, z kapky byl vyhotoven krevní nátěr, zbytek krve byl centrifugován, oddělena plasma a krvinky, plasma byla uložena do tekutého dusíku a následně do -80°C, krvinky byly rozmíchány v lihu a uloženy do -20°C. Poté byl každý samec zvážen pomocí pružinové váhy (v bavlněném sáčku; 0.5 g, Pesola) a byla mu změřena délka běháku pomocí digitálního posuvného měřítka (0.01 mm). Z váhy a délky

tarsu byl spočten parametr standardizovaná hmotnost (váha/délka běháku), který byl dále používán v analýzách.

Stejným způsobem jako u divoké populace byl ptákům v temném stanu oskenován karotenoidní proužek za okem a melaninová podkova na hrudi pro zjištění jejich velikosti, a zároveň jim byla změřena odrazivost karotenoidního proužku pomocí spektrometru.

Následujícího dne (18. 4.) byl proveden kožní PHA test. Jedincům byla pomocí digitálního mikrometru 3x změřena tloušťka levého patagia a do tohoto místa byl podkožně aplikován PHA (1 mg PHA ve 40 μ l PBS). Poté byli jedinci umístěni zpět do svých klecí a ponecháni v klidu až do opakovaného měření patagia. Otok způsobený vpichem mitogenu se měřil opět 3x v místě vpichu po 6 hodinách pomocí digitálního mikrometru. Následná otoková reakce na PHA byla vypočítána jako tloušťka patagia po aplikaci minus tloušťka patagia před aplikací.

Následně byli všichni samci rozřazeni do skupin podle pokusných skupin a označeni barevnými hliníkovými kroužky s čísly. Samotný experiment probíhal od 20.4. do 3.6. 2009. V experimentu se pracovalo se zdravotním stresem (LPS bakterií *E.coli*). Každý jedinec dostával 30g zrní na den, do kterého mu byly přidávány karotenoidy OroGlo v koncentraci dle pokusného měření. Jelikož jsme chtěli testovat hypotézu škodlivosti většího množství karotenoidů v organismu, pokud je jedinec vystaven stresu, chtěli jsme navýšit dávku karotenoidů na takovou míru, kdy by se jedinec měl vyhýbat stravě bohaté na karotenoidy, aby si udržel zdraví. Dávka podávaných karotenoidů (OroGlo Dry, Kemin Industries; 20 g aktivních xantofylů na 1 kg směsi) doporučená výrobcem je 20g směsi na 1kg krmiva, což odpovídá 0,6g směsi na 30g zrní, obsah xantofylů v této dávce je 0,012g karotenoidů. Tuto hodnotu jsme stanovili jako základní hladinu karotenoidů 1 (+). Další hladiny jsme stanovili 10x (2. hladina, ++, 0,12 g aktivních xantofylů v krmné dávce) a 100x větší než základní (3. hladina, +++, 1,2 g aktivních xantofylů). Dávka podávaných bakterií byla stanovena podle běžně používaných hodnot při podávání LPS (0,1 mg LPS) jako 0,3 mg a 3 mg usmrcených bakterií podávaných jednou týdně. Suspenze usmrcených bakterií *E.coli* K14 byla získána od Mgr. Jany Beranové z Katedry mikrobiologie, PřF UK.

Samce jsme rozřadili do 10 skupin po 5 ptácích. viz Tabulka 1.

Tabulka1. Pokusné skupiny a rozdělení dle podávaných karotenoidů a bakterií.

skupina	karotenoidy	bakterie
1	0	0
2	+	0
3	++	0
4	+++	0
5	+	+
6	++	+
7	+++	+
8	+	++
9	++	++
10	+++	++

Vysvětlivky:

Karotenoidy + = 0,012gOroGlo/ks/den

Karotenoidy ++ = 0,12gOroGlo/ks/den

Karotenoidy +++ = 1,2gOroGlo/ks/den

Bakterie + = 0,3mg/jednou týdně

Bakterie ++ = 3mg/jednou týdně

Ptáci byli po celý průběh pokusu krmeni každý den ráno v 7 hodin zrním s přidanými karotenoidy. Vodu měli k dispozici po celou dobu ad libitum. Jednou týdně jim byla intraperitoneálně podána suspenze bakterií (v množství dle daného treatmentu) v 1 ml fyziologickém roztoku. Kontrolním jedincům s hodnotou bakterií 0 bylo podáno pouze stejné množství fyziologického roztoku.

Závěrečné měření bylo provedeno ve dnech 4. a 5. 6. 2009. Jedinci byli opět zváženi, byla odebrána krev, byl vytvořen krevní nátěr, proběhlo měření barvy a velikosti ornamentu za okem při standardních podmínkách a nakonec byl proveden kožní otokový test na PHA.

Analýza dat proběhla stejným způsobem jako u divoké populace (viz metodika – kapitola Analýza dat). Ze získaných dat byly spočteny rozdíly hodnot před a po pokusu, které poté představovaly vysvětlované proměnné ve statistickém modelování.

2.3. *Statistické vyhodnocování dat*

Modelování proběhlo ve statistickém programu R 2.9.0 (The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org/>), ověřování normality, korelace a analýza hlavních komponent modelu PCA byla provedena v programu Statistica ver. 8.0 (StatSoft, Inc. 2007, <http://www.statsoft.com>).

Nejprve byla u závislých proměnných ověřena normalita pomocí Kolmogorov-Smirnov testu a byly spočteny charakteristiky variability. Korelace mezi jednotlivými proměnnými byly testovány pomocí Pearsonova korelačního koeficientu, v případě jiného než normálního rozdělení dat byl použit Spearmanův korelační koeficient, o souvislosti proměnných bylo rozhodováno na základě korelačního koeficientu a p hodnoty pro daný test. V případě silné korelace proměnných byla použita analýza hlavních komponent (PCA) pro zjednodušení korelovaných dat za minimální ztráty informace. Pro další výpočty byly dále uvažovány pouze faktory nejlépe vystihující variabilitu proměnných, ale vždy s eigenvalue vyšší než 1.

Pro analýzy jednotlivých modelů byl použit zobecněný lineární model (glm). Minimální adekvátní model byl získán postupným odstraňováním proměnných z nejkompexnějšího modelu (Crawley 2007). Nesignifikantní proměnné byly z modelu odstraňovány postupně pomocí funkce drop1. Správnost vyřazení proměnné z modelu byla ověřena pomocí F nebo Chí kvadrát statistiky (dle rozložení závislé proměnné). Přítomnost všech signifikantních hodnot v konečném minimálním adekvátním modelu byla založena na Type III Sum of squares (parciální efekt proměnné, kontrolovaný statisticky na ostatní proměnné v modelu). P hodnoty všech testů byly porovnávány s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Za signifikantní byly u všech testů považovány hodnoty $p < 0,05$.

2.3.1. Souvislost kondičních a imunologických parametrů a ornamentů

Z celkového počtu 85 zvířat z obou let, byla vyřazena 1 samice kvůli chybějícím hodnotám.

Na základě korelační matice (Tabulka 1) a Spearmanova korelačního koeficientu pro sledované parametry barvy bylo zjištěno, že spolu jednotlivé parametry korelují a proto byla pro další analýzu použita analýza hlavních komponent PCA (Tabulka 2). Faktor PC1 vysvětluje 45% variability a faktor PC2 29% variability.

Tabulka 2. Korelační matice sledovaných parametrů ornamentu (použit byl Spearmanův korelační koeficient, tučně označené korelační koeficienty jsou významné na hladině $p < 0,05$)

	H	Chr	Br	redchr
H	1,00	-0,01	-0,13	-0,02
Chr		1,00	0,10	0,74
Br			1,00	-0,46
RedChr				1,00

Tabulka 3. Korelace faktorů PCA analýzy a jednotlivých proměnných barvy ornamentu.

	PC1	PC2
Eigenvalue	1,83	1,16
Vysvětlená variabilita %	45,77	29,13
H	-0,041	0,605
Chr	-0,819	-0,458
Br	0,447	-0,767
RedChr	-0,978	0,007

Hlavními sledovanými parametry byly proměnné vysvětlující barvu ornamentu za okem = PC1 a PC2 a dále velikosti ploch obou sledovaných ornamentů.

Vysvětlujícími proměnnými zde byly tyto parametry: standardizovaná hmotnost (mass), otok způsobený mitogenem PHA, poměr heterofilů ku lymfocytům (H/L), poměr imaturních erytrocytů, absolutní počet erytrocytů a leukocytů na jednotku krve, aktivita komplementu (vyjádřená inverzně jako 1/čas), interakce jednotlivých proměnných s věkem a s pohlavím. Celkem tedy 23 parametrů na 84 jedinců.

Analýzy byly provedeny pomocí zobecněných lineárních modelů s parametry family= gaussian a link = identity.

2.3.2. Souvislost ornamentů s párováním

První závislou proměnnou je zde kategorická proměnná absolutní párování, která nabývá dvou hodnot – 0 – jedinec se nespároval a 1 – jedinec se spároval (n=84).

Druhou závislou proměnnou je rychlost párování vyjádřená jako počet dnů, které jedinec potřeboval ke spárování, počítané ode dne vypuštění zpět do přírody. Protože nás zajímalo, podle čeho si samice vybírají samce, byl tento model spočten pouze pro samce, kteří se spárovali.

Vysvětlujícími proměnnými v těchto analýzách byly: parametry barvy = PC1 a PC2, velikost plochy podkovy, velikost plochy karotenoidního proužku, pohlaví, věk a interakce pohlaví s každou proměnnou a věku s každou proměnnou. Celkem tedy 14 parametrů. U modelu párování samců byl vynechán parametr pohlaví a jeho interakce.

Statistická analýza absolutního párování byla provedena zobecněným lineárním modelem s Bernoulliho rozdělením (family=binomial) a link funkcí logit. Významnost vlivu jednotlivých faktorů byla ověřována z ANOVA tabulky pomocí χ^2 statistiky.

K analýze rychlosti párování byl použit zobecněný lineární model s Gamma rozdělením (family=gamma) a link funkcí „log“, kvůli přítomnosti nulových hodnot v datech. Doba přežívání byla zhodnocena modelem s rozložením gamma, link = inverse. Vliv jednotlivých faktorů byl u obou analýz ověřován pomocí F statistiky.

2.3.3. Experiment - Vliv suplementace na jedince

Pro sledované změny parametrů barvy byla spočtena korelační matice (Spearmanův korelační koeficient, $p < 0,05$; Tabulka 4) a poté PCA (Tabulka 5). Parametr PC3 zde vysvětluje 57% a PC4 35% variability.

Vysvětlované proměnné zde byly vyjádřeny jako rozdíl hodnot před suplementací a po suplementaci. Jsou to tyto parametry: PC3 a PC4, které popisují změnu barvy ornamentu za okem, změna velikosti plochy ornamentu za okem, změna váhy vyjádřená jako změna mass, změna otokové reakce jedince na mitogen PHA a změna poměru imaturních erytrocytů

Tabulka 4. Korelační matice sledovaných parametrů ornamentu (použit byl Spearmanův korelační koeficient, tučně označené korelační koeficienty jsou významné na hladině $p < 0,05$)

	Roz_H	Roz_Ch	Roz_Br	Roz_RedChr
Rozdíl_H	1,00	-0,42	0,38	-0,82
Rozdíl_Ch		1,00	0,42	0,56
Rozdíl_Br			1,00	-0,45
Rozdíl_RedChr				1,00

Tabulka 5. Korelace faktorů PCA analýzy a jednotlivých proměnných rozdílů barvy ornamentu.

	PC3	PC4
Eigenvalue	2,29	1,41
Vysvětlená variabilita %	57,41	35,36
Rozdil_H	0,919	-0,063
Rozdil_Ch	-0,579	-0,789
Rozdil_Br	0,416	-0,886
Rozdil_RedChr	-0,971	0,031

Vysvětlující proměnné byly kategoriální. První ukazovala dávku karotenoidů použitou v daných treatmentech a nabývala hodnot 0, 1, 2 a 3. Druhou je dávkování bakteriálního LPS, hodnoty 0, 1 a 2 (viz. Metodika). Třetí vysvětlující proměnnou byla interakce mezi karotenoidy a bakteriemi.

Analýzy byly provedeny zobecněnými lineárními modely (family= gaussian, link = identity).

Vysvětlivky

Ve všech tabulkách jsou použity následující zkratky pro označení jednotlivých proměnných:

H = barva ornamentu (hue),

Chr = sytost ornamentu (chroma),

Br = jas barvy (brightness),

RedChr = červenost barvy (red chroma)

Proužek = velikost plochy karotenoidního proužku vedle oka,

Podkova = velikost plochy melaninového ornamentu na hrudi.

Er = počet erytrocytů na jednotku krve

Leu = počet leukocytů na jednotku krve

ImmEr = poměr imaturních a dospělých erytrocytů

H/L = poměr heterofilů a lymfocytů

Komplement = rychlost usmrcování bakterií

PHA = otok vzniklý v důsledku působení PHA

mass = standardizovaná hmotnost (váha/délka běháku)

sex = pohlaví

věk.

3. Výsledky

3.1. Divoká populace

V roce 2009 se podařilo odchytit 52 jedinců (samice $n=22$, samci $n=30$), v roce 2010 pouze 33 jedinců (samice $n=13$, samci $n=20$), celkem tedy 85 jedinců (samice $n=35$, samci $n=50$). Jedinci se lišili věkem, v roce 2009 jsme měli k dispozici 27 mladých (do 1 roku stáří; z toho 10 samic a 17 samců) a 24 koroptví starších 1 roku (z toho 11 samic a 13 samců), v roce 2010 to bylo 27 mladých (11 samic a 16 samců) a pouze 6 jedinců starších 1 roku (2 samice a 4 samci). Ze všech analýz byla vyřazena jedna samice, z důvodu chybějících dat ($n=84$).

Data z jednotlivých roků byla sloučena na základě porovnání jednotlivých proměnných mezi roky pomocí t testu. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 6. Mezi vysvětlovanými proměnnými nebyl nalezen průkazný rozdíl mezi roky. Data byla proto sloučena (i vzhledem k malému vzorku jedinců získaných v jednotlivých letech).

Tabulka 6. Porovnání vysvětlovaných proměnných mezi roky, $n=84$.

	Rok 2009	Rok 2010			Rok 2009	Rok 2010
	Průměr ± SE	Průměr ± SE	t - test	p	n	n
H	0,7±0,05	0,7±0,24	1,131	0,261	51	33
Chr	61858,5±23397,16	61212,3±28347,41	0,113	0,909	51	33
Br	151602,1±41661,70	161540,8±29387,39	-1,191	0,237	51	33
RedChr	46,3±9,84	45,8±11,45	0,234	0,815	51	33
Proužek	31,2±16,52	24,3±18,04	1,804	0,074	51	33
Podkova	13,7±8,01	12,6±9,12	0,589	0,557	51	33

3.1.1. Vliv kondičních a imunologických parametrů na barvu a velikost karotenoidního ornamentu a velikost melaninového ornamentu

Pro statistickou analýzu vlivu kondičních a imunologických parametrů bylo použito celkem 84 jedinců z obou let.

Charakteristiky variability barvy a velikosti ornamentů divoké populace jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7. Hodnoty sledovaných parametrů ornamentů.

	N	Průměr	Minimum	Maximum	SE
H	84	0,7	-0,1	1,3	0,16
Chr	84	61604,6	9712,7	120381,8	25292,06
Br	84	155506,6	88776,4	267297,9	37448,73
RedChr	84	46,1	26,3	68,0	10,44
Proužek	84	28,5	1,7	62,3	17,36
podkova	84	13,3	0,0	29,5	8,43

3.1.2. Závislost exprese různých ornamentů

Při zjišťování vztahu velikosti ornamentů byl použit neparametrický test, protože hodnoty neodpovídaly normálnímu rozložení. Byla nalezena průkazná korelace velikostí obou sledovaných ornamentů (Spearmanův koeficient korelace, $r = 0,529$; $p < 0,001$; $n = 84$).

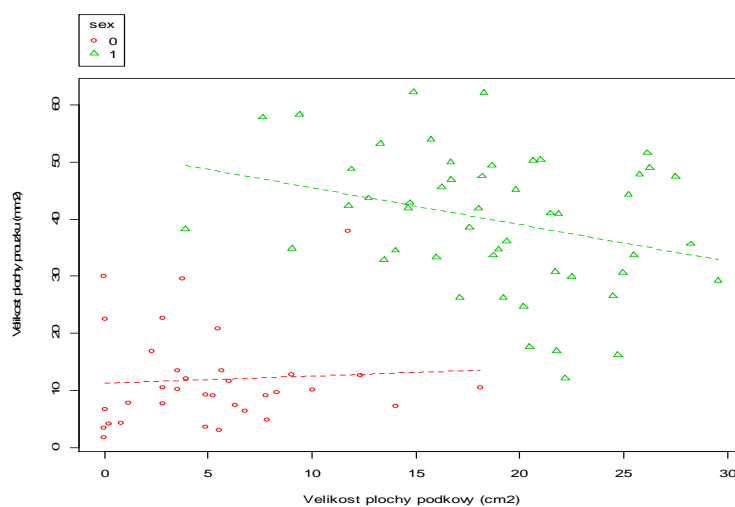
Velikost ploch obou ornamentů se liší v závislosti na pohlaví (viz tabulka 8, Graf 1).

Barva (parametr PC1) korelovala jak s velikostí plochy karotenoidního proužku ($r=0.796$, $p<<0,001$, $df = 82$), tak i s velikostí plochy melaninové podkovy ($r=0.534$, $p<<0,001$, $df = 82$; Graf 2 a 3).

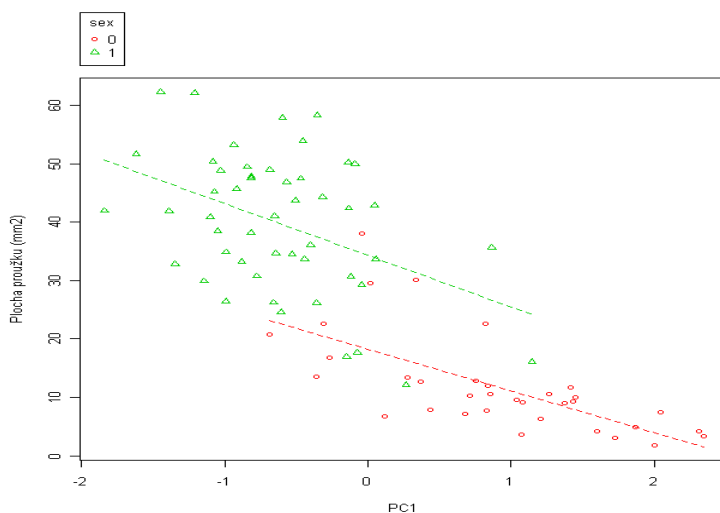
Tabulka 8. Porovnání velikosti plocha obou ornamentů a parametrů barvy v závislosti na pohlaví pomocí *t* testu.

	samice	samci				samice	samci
	Průměr ± SE	Průměr ± SE	t test	df	p	N	N
Proužek	11,9 ± 8,40	39,8 ± 11,87	-11,837	82	0,000	34	50
Podkova	8,1 ± 4,20	-5,5 ± 5,63	11,968	82	0,000	34	50
PC1	0,9 ± 0,791	-0,6 ± 0,570	-10,201	82	0,000	34	50
PC2	0,1 ± 1,163	-0,1 ± 0,868	-1,165	82	0,247	34	50

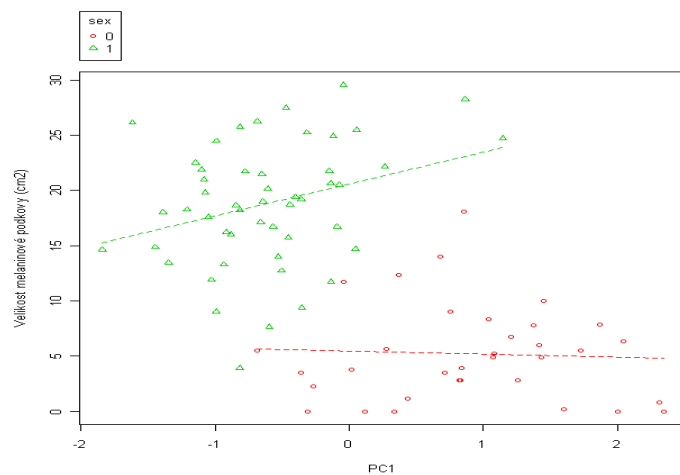
Graf 1. Souvislost ploch obou ornamentů v závislosti na pohlaví, n=84 (0-samice, 1-samci).



Graf 2. Souvislost velikosti plochy proužku s barvou ornamentu PC1, v závislosti na pohlaví, n=84. (0 – samice, 1 – samci)



Graf 3. Souvislost velikosti melaninové podkovy a barvy ornamentu v závislosti na pohlaví, n=84. (0 – samice, 1 – samci)



3.1.3. Barva ornamentu

Protože spolu jednotlivé parametry barvy (barva, jas, sytost barvy a červenost barvy) průkazně korelovaly, byla pro ně spočítána analýza hlavních komponent PCA, ze které vyšly dva faktory (viz tabulka 3, v kapitole Statistické vyhodnocování dat). Z dané tabulky vyplývá, že ptáci s nižšími hodnotami PC1 mají sytější barvu a červenější barvu a méně jasný (lesklý) ornament. Ptáci s nižšími hodnotami PC2 mají větší hodnoty jasnější a sytější barvu a spíše červený než oranžový ornament.

PC1

Nejprve byl spočten model pro parametr PC1. Vysvětlující proměnné a plný počáteční model je uveden v tabulce 3. Po odebrání nesignifikantních proměnných byl získán minimální adekvátní model (tabulka 9). Model, který vysvětloval závislost PC1 na věku, pohlaví, komplementu a interakci věk:komplement byl vysoce průkazný ($n=84$, $F=31.418$, $p \ll 0.001$; tabulka 10).

Tabulka 9. Počáteční plný model pro PC1, $n=84$.

proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	-0.465 \pm 2.544		
Mass	0.201 \pm 0.333	0.155	0.695
Věk	2.221 \pm 3.634	2.291	0.135
Sex	0.151 \pm 3.143	101.980	<<0,001
PHA	0.222 \pm 0.662	2.108	0.151
H/L	-0.004 \pm 0.074	0.450	0.504
Er	0.020 \pm 0.314	0.116	0.734
ImmEr	-0.229 \pm 0.152	0.842	0.362
Komplement	0.001 \pm 0.496	0.832	0.365
Leu	0.035 \pm 0.028	0.696	0.407
Mass:sex	-0.389 \pm 0.368	1.260	0.266
Mass:věk	0.245 \pm 0.431	1.068	0.305
PHA:sex	0.181 \pm 0.775	0.001	0.968
PHA:věk	-1.107 \pm 0.973	1.313	0.256
HL:sex	-0.015 \pm 0.087	0.000	0.982
HL:věk	0.044 \pm 0.088	0.250	0.618
Er:sex	0.083 \pm 0.363	0.296	0.588
Er:věk	-0.289 \pm 0.415	0.654	0.421
ImmEr:sex	0.152 \pm 0.152	0.410	0.524

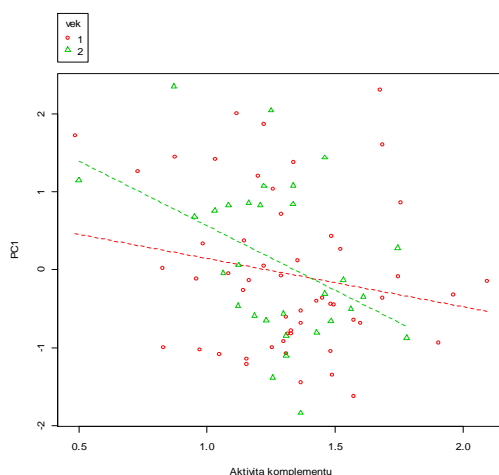
ImmEr:věk	0.089 ± 0.163	0.640	0.426
Komplement:sex	0.269 ± 0.608	0.193	0.661
Komplement:věk	-1.518 ± 0.637	6.663	0.012
Leu:sex	-0.007 ± 0.032	0.110	0.740
Leu:věk	-0.058 ± 0.037	2.365	0.129

Tabulka 10. Minimální adekvátní model pro PC1: $n=84$, $df=4$, $F=31.418$, $p < 0.001$.

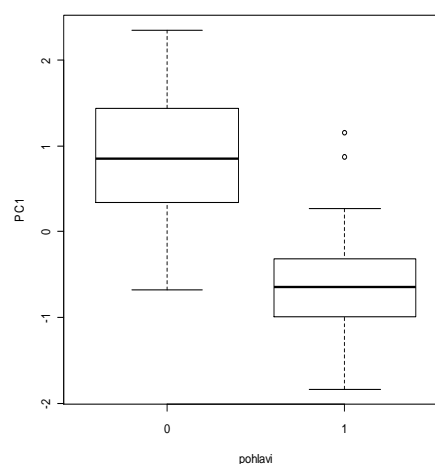
proměnná	Estimate ±SE	F	P
(Intercept)	0.522 ± 0.387		
Věk	-1.096 ± 0.501	8.646	0.004 **
Sex	-1.499 ± 0.147	102.320	<< 0,001 ***
Komplement	0.066 ± 0.361	5.997	0.016 *
Věk:komplement	1.433 ± 0.581	8.295	0.005 **

Vyšší PC1 měly samice, a jedinci starší 1 roku, což znamená, že tito jedinci měli méně sytý a méně červený ornament. Aktivita komplementu, vyjádřená inverzně jako: 1/doba do kdy byla zabita polovina bakterií ve vzorku, byla vyšší (komplement byl méně účinný) opět u jedinců s vyššími hodnotami PC1 (graf 4). Což naznačuje, že sytost a červenost ornamentu průkazně pozitivně koreluje se schopností jedince vypořádat se s bakteriálními parazity.

Graf 4. Graf závislosti PC1 na aktivitě komplementu, rozdělení dle věku. Věk 1 – jedinci ve stáří 1 roku, 2 - jedinci starší než 1 rok.



Graf 5. Souvislost barvy ornamentu a pohlaví (0-samice, 1-samci)



PC2

V tabulce 11 je uveden plný počáteční model pro barvu ornamentu – proměnnou PC2. Po odstranění nesignifikantních proměnných zůstal v modelu vliv pohlaví, věku a interakcí poměru imaturních erytrocytů s věkem a aktivity komplementu s pohlavím ($F=3.266$, $p \ll 0.006$; tabulka 12).

Tabulka 11. Počáteční plný model pro PC2, $n=84$.

proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	3.631 \pm 3.606		
Mass	-0.267 \pm 0.472	0.553	0.459
Věk	-3.691 \pm 5.151	0.547	0.462
Sex	-2.231 \pm 4.455	1.489	0.227
PHA	0.055 \pm 0.938	0.078	0.781
H/L	0.015 \pm 0.105	0.068	0.794
Er	0.068 \pm 0.445	0.201	0.655
ImmEr	0.014 \pm 0.215	4.629	0.035
Komplement	-1.117 \pm 0.704	0.581	0.448
Leu	-0.027 \pm 0.040	0.485	0.488
Mass:sex	0.265 \pm 0.521	0.146	0.703
Mass:věk	0.550 \pm 0.611	0.447	0.506
PHA:sex	0.189 \pm 1.099	0.108	0.743
PHA:věk	-2.037 \pm 1.379	2.595	0.112
HL:sex	-0.138 \pm 0.123	2.782	0.101
HL:věk	0.096 \pm 0.125	3.148	0.081
Er:sex	-0.662 \pm 0.515	2.233	0.141
Er:věk	0.229 \pm 0.589	0.001	0.991
ImmEr:sex	-0.040 \pm 0.215	0.293	0.591
ImmEr:věk	-0.407 \pm 0.232	3.280	0.075
Komplement:sex	1.923 \pm 0.862	5.318	0.024
Komplement:věk	1.072 \pm 0.903	1.379	0.244
Leu:sex	0.028 \pm 0.046	0.385	0.537
Leu:věk	0.010 \pm 0.053	0.037	0.846

Tabulka 12. Minimální adekvátní model pro PC2: $n=84$, $df=6$, $F=3.266$, $p \ll 0.006$.

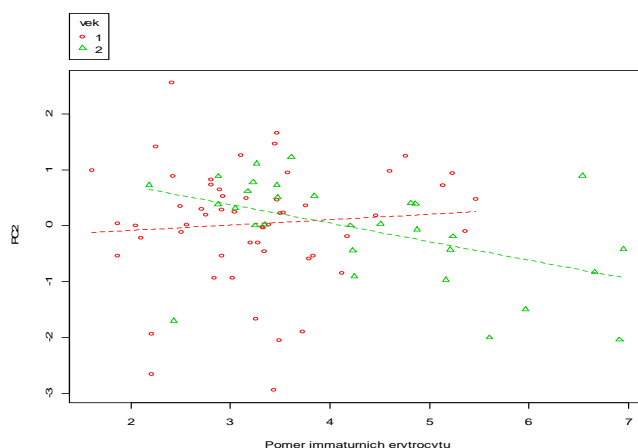
proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	0.906 \pm 0.913		
Věk	1.839 \pm 0.752	5.975	0.017 *
Sex	-3.173 \pm 0.983	10.411	0.002 **

ImmEr	0.114 ± 0.146	3.272	0.074
Komplement	-0.921 ± 0.596	2.379	0.127
Věk:ImmEr	-0.456 ± 0.191	5.695	0.019 *
Sex:komplement	2.219 ± 0.759	8.534	0.004 **

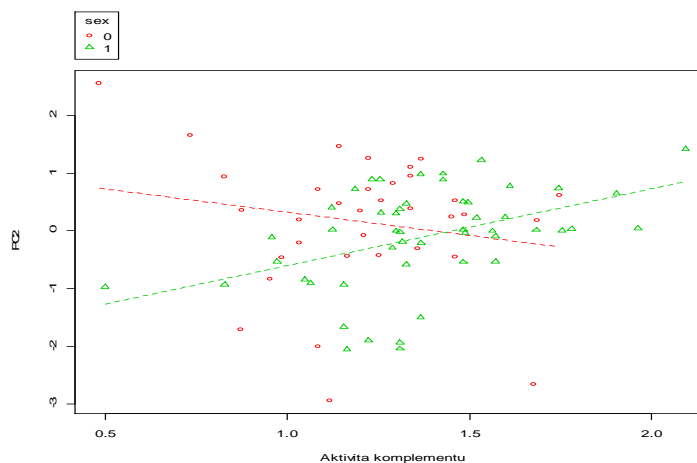
Vyšší PC2 měly samice a mladší jedinci, čili ti s méně jasným a spíše oranžovým než červeným znakem. Z grafu vyplývá, že mladí jedinci mají méně jasný a spíše oranžový ornament při vysokém počtu imaturních erytrocytů v krvi a naopak starší jedinci mají jasnější a červenou barvu při větším podílu imaturních erytrocytů (graf 6).

Samice měly delší čas aktivity komplementu při vyšší PC2, čili pokud měla méně jasný a spíše oranžový ornament, pak komplementu déle trvalo, než zabil bakterie ve vzorku, naopak u samců je pomalejší aktivita komplementu asociována s červenějším a jasnějším ornamentem (graf 7).

Graf 6. Souvislost barvy ornamentu (PC2) s poměrem imaturních erytrocytů, n=84. (věk 1 – mladší jedinci do 1 roku, 2 – jedinci starší než 1 rok)



Graf 7. Závislost parametru barvy ornamentu (PC2) na aktivitě komplementu a pohlaví, n=84. (0 – samice, 1 – samci)



3.1.4. Velikost ornamentů

Souvislost velikosti ornamentů s kondicí byla počítána pro $n=84$ a zahrnovala samce i samice. Protože se kondice může lišit v závislosti na věku či pohlaví jedince, byly tyto faktory dány do interakcí s parametry imunitního systému.

Velikost plochy karotenoidního proužku

V tabulce 13 je počáteční plný model pro velikost karotenoidního proužku za okem. A dále je uvedena tabulka (Tabulka 14) s minimálním adekvátním modelem, který vyšel po odstranění nesignifikantních parametrů modelu.

Tabulka 13. Počáteční plný model pro velikost plochy karotenoidního ornamentu, $n=84$.

proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	26.563 \pm 37.729		
Mass	-2.634 \pm 4.941	2.507	0.118
Věk	-68.681 \pm 53.897	3.468	0.067
Sex	11.461 \pm 46.614	158.131	<<0,001
PHA	3.313 \pm 9.817	2.314	0.133
H/L	0.981 \pm 1.106	0.287	0.594
Er	-1.079 \pm 4.660	1.533	0.220
ImmEr	-1.428 \pm 2.256	0.754	0.388
Komplement	6.168 \pm 7.369	0.001	0.980
Leu	0.280 \pm 0.419	0.157	0.692
Mass:sex	-6.926 \pm 5.459	0.319	0.573
Mass:věk	7.660 \pm 6.394	6.345	0.014
PHA:sex	1.716 \pm 11.501	0.096	0.756
PHA:věk	15.453 \pm 14.431	0.432	0.513
HL:sex	-1.551 \pm 1.291	0.974	0.327
HL:věk	0.297 \pm 1.314	0.086	0.769
Er:sex	4.275 \pm 5.394	0.297	0.587
Er:věk	6.093 \pm 6.164	1.265	0.265
ImmEr:sex	1.586 \pm 2.254	0.348	0.557
ImmEr:věk	1.633 \pm 2.431	0.762	0.386
Komplement:sex	-2.426 \pm 9.022	0.115	0.734
Komplement:věk	-16.291 \pm 9.457	3.057	0.085
Leu:sex	-0.303 \pm 0.485	0.431	0.513
Leu:věk	-0.258 \pm 0.561	0.212	0.646

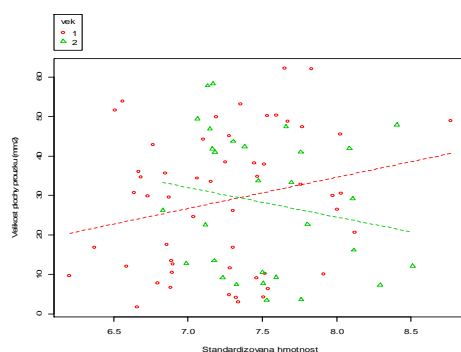
Tabulka 14. Minimální adekvátní model pro velikost plochy karotenoidního ornamentu: $n=84$, $df=6$, $F=32.882$, $p<<0.001$.

Proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	59.996 \pm 19.907		
Mass	-6.826 \pm 2.524	6.690	0.012 *
Věk	-48.910 \pm 40.117	1.486	0.227
Sex	-27.839 \pm 2.198	160.370	<<0.001 ***
Komplement	4.177 \pm 4.407	3.946	0.051
Mass : věk	10.024 \pm 4.826	4.315	0.041 *
Komplement : věk	-17.953 \pm 8.193	4.801	0.032 *

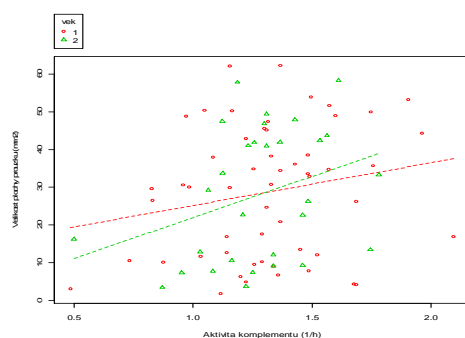
V tomto modelu vyšel průkazný vliv standardizované hmotnosti, pohlaví a interakce standardizované hmotnosti s věkem a aktivity komplementu s věkem ($n=84$, $F=32.882$, $p<<0.001$; viz. Tabulka 14).

Samci mají prokazatelně větší plochu karotenoidního ornamentu než samice (Graf 1). U mladých jedinců byla velikost plochy pozitivně korelována se standardizovanou hmotností, což znamená, že větší proužek se vyskytoval u potenciálně menších jedinců (větší podíl hmotnost/délka běháku). U starších jedinců tomu bylo naopak a větší proužek se vyskytoval u potenciálně větších jedinců (menší podíl hmotnost/délka běháku) (viz Graf 8). Jedinci s větším proužkem měli vyšší aktivitu komplementu a mohli se tak rychleji zbavovat bakteriálních parazitů (Graf 9).

Graf 8. Závislost velikosti plochy proužku na standardizované hmotnosti a věku, $n=84$.



Graf 9. Závislost velikosti plochy karotenoidního proužku na aktivitě komplementu a věku, n=84.



Velikost plochy melaninové podkovy

V tabulce 15 je uveden počáteční plný model pro velikost melaninového ornamentu. Po odstranění neprůkazných proměnných vyšla závislost velikosti tohoto ornamentu průkazně na standardizované hmotnosti, věku, poměru heterofilů a lymfocytů a interakcích PHA:pohlaví a imaturní erytrocyty:věk (n=84, $F=26.795$, $p < 0,001$; tabulka 16).

Tabulka 15. Počáteční plný model pro velikost melaninového ornamentu, n=84.

proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	18.245 \pm 17.451		
Mass	-1.941 \pm 2.285	3.561	0.064
Věk	16.308 \pm 24.928	1.089	0.301
Sex	-11.541 \pm 21.560	174.319	<< 0,001
PHA	1.788 \pm 4.540	4.666	0.034
H/L	-0.911 \pm 0.511	6.994	0.010
Er	1.166 \pm 2.155	0.031	0.861
ImmEr	0.234 \pm 1.043	2.837	0.097
Komplement	1.123 \pm 3.408	1.079	0.302
Leu	-0.031 \pm 0.193	1.098	0.298
Mass:sex	-0.027 \pm 2.525	0.438	0.510
Mass:věk	-0.756 \pm 2.957	2.811	0.098
PHA:sex	-11.833 \pm 5.319	6.052	0.016
PHA:věk	-2.866 \pm 6.675	0.043	0.835
HL:sex	0.281 \pm 0.597	0.143	0.705
HL:věk	-0.516 \pm 0.607	0.017	0.894
Er:sex	-0.095 \pm 2.494	0.171	0.681
Er:věk	-2.461 \pm 2.851	1.537	0.219
ImmEr:sex	0.912 \pm 1.042	1.203	0.277
ImmEr:věk	-2.336 \pm 1.124	5.707	0.020
Komplement:sex	0.301 \pm 4.173	0.003	0.951
Komplement:věk	5.841 \pm 4.374	2.127	0.149
Leu:sex	0.130 \pm 0.224	0.440	0.509
Leu:věk	0.324 \pm 0.259	1.565	0.215

Tabulka 16. Minimální adekvátní model pro velikost plochy melaninového ornamentu ($n = 84$, $df=8$, $F=26.795$, $p < 0,001$).

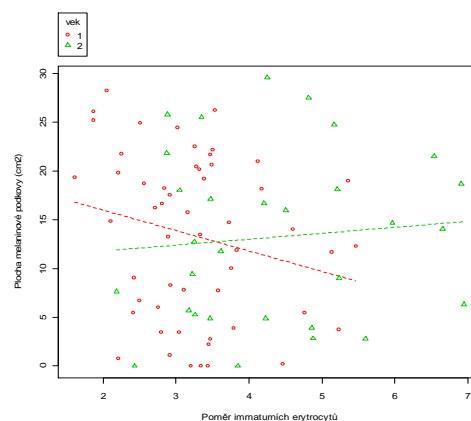
proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	24.159 \pm 8.340		
Mass	-2.317 \pm 1.054	4.832	0.031 *
Věk	9.046 \pm 3.675	6.058	0.016 *
Sex	-5.872 \pm 3.142	3.493	0.065
PHA	1.627 \pm 3.567	0.208	0.649
H/L	-0.704 \pm 0.236	8.948	0.004 **
ImmEr	0.578 \pm 0.707	3.227	0.076
PHA : sex	-11.954 \pm 4.555	6.885	0.011 *
ImmEr : věk	-2.184 \pm 0.943	5.366	0.023 *

Velikost podkovy u mladých jedinců může předpovídat rychlost krvetvorby.

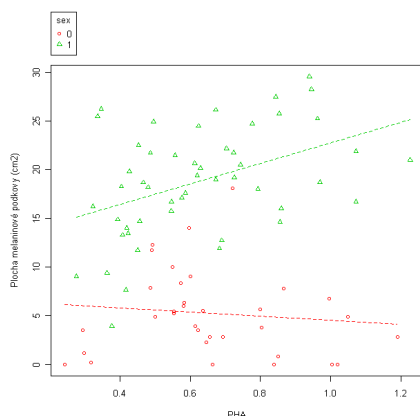
Zatímco u starších jedinců je znak poměrně rovnoměrně rozložen a nevypovídá tedy o rychlosti krvetvorby (Graf 10).

Samci s větší plochou podkovy mají větší otok po aplikaci PHA, zatímco u samic je tento trend spíše opačný (Graf 11).

Graf 10. Závislost velikosti plochy melaninové podkovy na poměru imaturních erytrocytů, $n=84$. (věk 1 – mladí do 1 roku, 2 – jedinci starší 1 roku)



Graf 11. Závislost velikosti plochy melaninové podkovy na velikosti otoku po aplikaci PHA a pohlaví, $n=84$ (0-samice, 1 – samci).



3.1.5. Vliv ornamentů na párování jedince

3.1.5.1. Absolutní párování

Počáteční plný model pro párování je uveden v tabulce 17. Bylo počítáno se všemi jedinci, samci i samice (n=84). Schopnost jedince se spárovat byla průkazně ovlivněna hodnotou barvy jeho ornamentu a interakcí barvy a věku ($\chi^2 = 11.254$, $p = 0.010$; tabulka 18).

Tabulka 17. Počáteční plný model pro absolutní spárování jedinců, $n = 84$.

proměnná	Estimate \pm SE	Chi	P
(Intercept)	1.275 \pm 2.544		
PC1	5.513 \pm 2.658	97.135	0.023
PC2	3.961 \pm 1.859	92.537	0.119
Pohlaví	-1.061 \pm 2.516	96.841	0.588
Věk	0.461 \pm 0.742	94.966	0.171
Plocha proužku	0.065 \pm 0.132	91.500	0.309
Plocha podkovy	-0.354 \pm 0.229	88.981	0.112
PC1:věk	-3.141 \pm 1.501	84.769	0.042
PC1:sex	-1.152 \pm 1.479	88.891	0.764
PC2:věk	-2.081 \pm 1.068	78.916	0.035
PC2:sex	-1.465 \pm 1.075	83.382	0.239
Plocha proužku:věk	-0.005 \pm 0.065	78.444	0.835
Plocha proužku:sex	-0.047 \pm 0.102	78.488	0.513
Plocha podkovy:věk	0.125 \pm 0.086	75.901	0.138
Plocha podkovy:sex	0.131 \pm 0.194	78.096	0.555

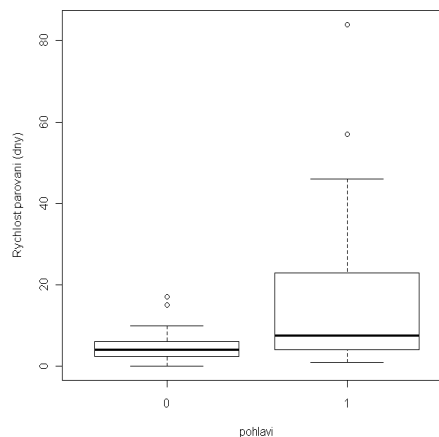
Tabulka 18. Minimální adekvátní model pro absolutní párování: $n=84$, $df=3$, $\chi^2 = 11.254$, $p = 0.010$.

Proměnná	Estimate \pm SE	Chi	P(> Chi)
(Intercept)	0.269 \pm 0.835		
PC1	2.283 \pm 0.938	-7.056	0.008
Věk	0.574 \pm 0.582	-0.998	0.318
PC1 : věk	1.240 \pm 0.612	-4.285	0.038

3.1.5.2. Rychlost párování samců

Rychlost párování byla spočtena pouze pro samce, protože nás zajímalo, na základě jakého znaku si samice vybíraly partnera. Všechny samice se navíc spárovaly velmi brzy (Graf 12). Z analýzy byli vyřazeni nespárovaní jedinci (celkové $n=30$). Plný počáteční model rychlosti párování samců je uveden v tabulce 19.

Graf 12. Rychlost párování v závislosti na pohlaví ($n=61$; 0 - samice, 1 - samci).



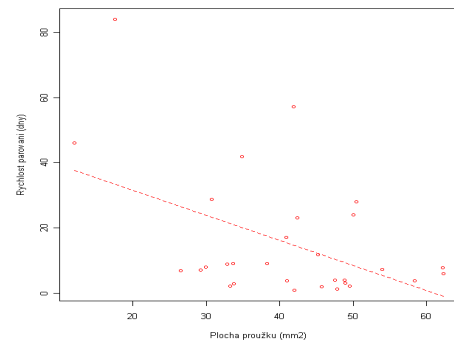
Tabulka 19. Počáteční plný model pro rychlost párování spárovaných samců, $n=30$.

proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	4.101 \pm 1.486		
PC1	1.358 \pm 1.401	2.368	0.139
PC2	-0.346 \pm 0.731	3.123	0.092
Věk	-0.497 \pm 1.159	0.769	0.391
Plocha proužku	-0.012 \pm 0.065	8.930	0.007 **
Plocha podkovy	-0.028 \pm 0.101	0.077	0.783
PC1:věk	-0.982 \pm 0.841	1.002	0.328
PC2:věk	0.395 \pm 0.444	1.529	0.231
Plocha proužku:věk	0.048 \pm 0.055	0.286	0.598
Plocha podkovy:věk	0.038 \pm 0.071	0.174	0.681

Po odstranění nesignifikantních proměnných z plného modelu zbyla v minimálním adekvátním modelu pouze jedna průkazná proměnná - velikost plochy karotenoidního proužku ($n=30$, Estimate \pm SE= 3.234 \pm 0.259, $df=1$, $F=10.510$, $p=0.003$).

Jedinec s nejmenším ornamentem se spároval nejpozději, jak je vidět na grafu 13. Výsledek je ovlivněn malou velikostí vzorku, pro potvrzení by bylo třeba sledovat více jedinců.

Graf 13. Rychlost párování samců v závislosti na velikosti plochy karotenoidního proužku, $n=30$.



3.2. Experiment - vliv pokusu na změnu sledovaných proměnných

V experimentu byla použita data od 41 samců stejně starých samců (1 rok), 9 jedinců zemřelo v průběhu pokusu.

Protože spolu jednotlivé parametry změny barvy (změna barvy, změna jasu, změna sytosti barvy a změna červenosti barvy) průkazně korelovali, byla pro ně spočítána analýza hlavních komponent PCA (viz Statistické vyhodnocování dat, tabulka 4 a 5), PC3 koreloval negativně s červeností barvy (red chroma) a pozitivně s barvou (hue). PC4 koreloval negativně se sytostí (chroma) a jasnem (brightness). Z toho vyplývá, že větší hodnoty PC3 měli ptáci, u kterých se v důsledku pokusu více změnila barva a méně červenost barvy. Větší hodnoty PC4 měli ti, u kterých došlo k menší změně sytosti a jasu barvy.

V tabulce 20 jsou popsány charakteristiky změn jednotlivých vysvětlovaných proměnných.

Tabulka 20. Charakteristiky variability rozdílu sledovaných vysvětlovaných proměnných, n=41.

	Průměr	Minimum	Maximum	SE
Rozdil_mass	-0,68	-3,2	0,4	0,68
Rozdil_PHA	-0,05	-0,8	0,5	0,34
Rozdil_proužek	-9,75	-27,2	8,7	8,78
Rozdil_ImmEr	-1,05	-6,3	2,7	1,92
Rozdil_H	0,00	-0,1	0,1	0,04
Rozdil_Chrom	20485,15	-21376,7	64552,1	20788,77
Rozdil_Br	40902,93	-35866,3	127186,8	39435,88
Rozdil_RedChrom	1,52	-17,9	14,9	7,72

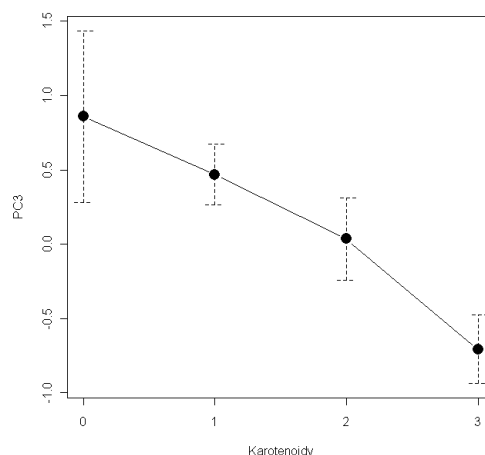
3.2.1. Vliv na barvu a velikost karotenoidního ornamentu

Na změnu barvy (proměnná PC3) mělo vliv podávání karotenoidů ($n=41$, $F=17.725$, $p<<0,001$). To mělo průkazný vliv i na změnu velikosti plochy karotenoidního proužku ($n=41$, $F=5.529$, $p=0.023$). Podávání karotenoidů ani bakterií nemělo vliv na druhý parametr barvy - proměnnou PC4 ($n=41$, $F=1.534$, $p=0.2229$).

V tabulkách 21-23 jsou počáteční modely těchto vysvětlovaných proměnných.

Srovnáním jednotlivých hodnot podávaných karotenoidů s kontrolou byla zjištěna průkazná změna barvy (proměnná PC3) při podávání karotenoidů v množství 1,2 g ($t = -3.221$, $p = 0.002$) a průkazná změna velikosti plochy karotenoidního proužku při podávání karotenoidů v množství 0,12 g ($t = 2.119$, $p = 0.041$). Barva ornamentu (PC3) zčervenala v závislosti na dávce karotenoidů (graf 14).

Graf 14. Změna barvy ornamentu (PC3) v závislosti na dávce karotenoidů (0 – kontrola, 1- 0,012 g, 2 – 0,12 g, 3 – 1,2 g karotenoidů/den)



Tabulka 21. Počáteční plný model pro změnu barvy, proměnná PC3, $n = 41$.

proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	1.103 \pm 0.332		
bakterie	-0.194 \pm 0.375	0.106	0.746
karotenoidy	-0.661 \pm 0.171	17.698	<<0,001
bakterie:karotenoidy	0.158 \pm 0.1747	0.827	0.368

Tabulka 22. Počáteční plný model pro změnu barvy, proměnná PC4, $n = 41$.

proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	-0.411 \pm 0.399		
bakterie	0.127 \pm 0.451	0.205	0.653
karotenoidy	0.21 \pm 0.204	1.285	0.264
bakterie:karotenoidy	-0.047 \pm 0.209	0.051	0.822

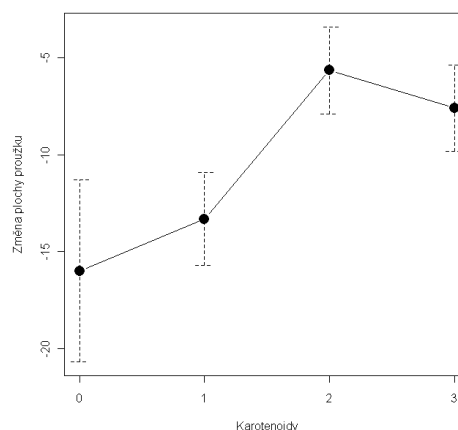
Tabulka 23. Počáteční plný model pro změnu velikosti plochy proužku, $n = 41$.

proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	-16.567 \pm 3.198		
bakterie	2.354 \pm 3.610	0.508	0.480
karotenoidy	4.804 \pm 1.639	6.936	0.012
bakterie:karotenoidy	-2.330 \pm 1.680	1.924	0.173

Plocha karotenoidního ornamentu se nejvíce zvětšila při podávání 0,12 g karotenoidů (10 x vyšší dávka než doporučené množství), což může ukazovat na určité plato v příjmu, kdy další zvyšování dávky karotenoidů nemusí mít vliv na zvětšení znaku.

Skupina, která dostávala dávky karotenoidů v množství 0,12g se průkazně liší ve velikosti plochy karotenoidního ornamentu od kontroly ($t=-2,263$, $p=0,042$) a skupiny 1 ($t=-2,274$, $p=0,033$), ale od třetí skupiny už se průkazně neliší ($t=0,601$, $p=0,553$; graf 15).

Graf 15. Změna velikosti proužku v závislosti na podávání karotenoidů. (0 – kontrola, 1– 0,012 g, 2 – 0,12 g, 3 – 1,2 g karotenoidů/den)



3.2.2. Vliv na váhu

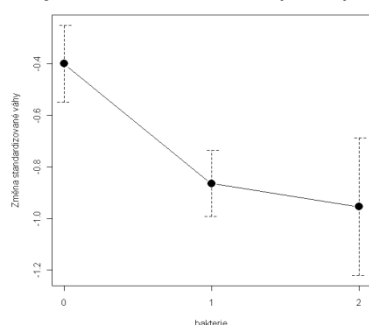
Na změnu váhy mělo vliv podávání bakterií ($n=41$, Slope \pm SE= -0.294 ± 0.124 , $df=1$, $F=5.561$, $p=0.023$). V tabulce 24 je počáteční plný model.

Od kontroly se průkazně lišila pouze změna váhy při podávání bakterií v množství 3 mg ($t= -2,176$, $p=0,035$; Graf 16).

Tabulka 24. Počáteční plný model pro rozdíl standardizované váhy, $n=41$.

proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	-0.437 \pm 0.258		
bakterie	-0.275 \pm 0.292	5.277	0.027
karotenoidy	-0.005 \pm 0.132	0.009	0.921
bakterie:karotenoidy	-0.008 \pm 0.135	0.004	0.949

Graf 16. Závislost změny váhy na podávání bakterií (0 – kontrola, 1 – 0,3mg bk, 2 – 3mg bk).



3.2.3. Vliv na změnu otoku PHA a změnu v poměru imaturních erytrocytů

Počáteční plné modely jsou pro tyto parametry v tabulkách (Tabulka 25 a 26).

Odebrání nesignifikantních proměnných nevedlo k žádnému minimálnímu adekvátnímu modelu pro změnu otoku PHA ($n = 41$, $F=2.524$, $p = 0.121$), ani pro změnu v poměru imaturních erytrocytů ($n = 41$, $F = 2.291$, $p = 0.114$).

Tabulka 25. Počáteční plný model pro změnu otoku po PHA, $n=41$.

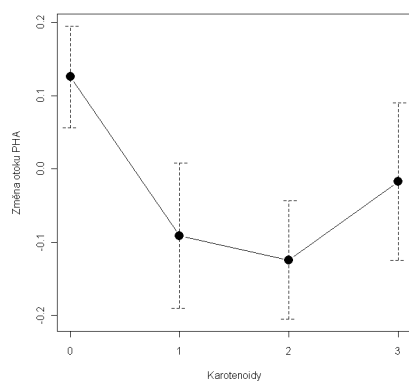
proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	0.001 \pm 0.132		
bakterie	-0.075 \pm 0.149	2.399	0.129
karotenoidy	0.017 \pm 0.067	0.026	0.872
bakterie:karotenoidy	-0.015 \pm 0.069	0.047	0.828

Tabulka 26. Počáteční plný model pro změnu poměru Imaturních erytrocytů, $n=41$.

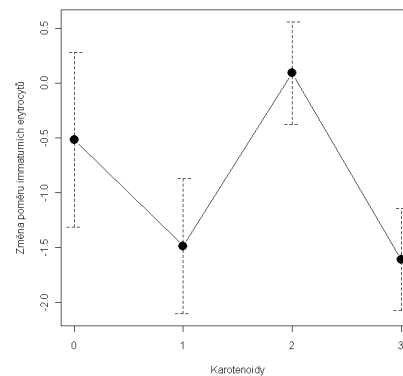
proměnná	Estimate \pm SE	F	P
(Intercept)	-0.501 \pm 0.774		
bakterie	-0.527 \pm 0.874	0.021	0.886
karotenoidy	-0.311 \pm 0.396	0.231	0.633
bakterie:karotenoidy	0.269 \pm 0.406	0.437	0.512

Nebyl nalezen žádný efekt, ale z grafů je patrný vliv jednotlivých dávek karotenoidů na změnu otoku PHA (graf 17) a změnu poměru Imaturních erytrocytů (graf 18). U jedinců s dávkou karotenoidů 0,12g (10x vyšší než doporučená dávka) nejvíce vzrostl poměr imaturních erytrocytů a zároveň otok po injekci PHA se v průběhu pokusu nejvíce zmenšil. Jedincům s těmito dávkami karotenoidů také nejvíce vzrostla plocha proužku a sytost barvy.

Graf 17. Změna otoku po PHA v souvislosti s podáváním karotenoidů (0 – kontrola, 1- 0,012 g, 2 – 0,12 g, 3 – 1,2 g karotenoidů/den)



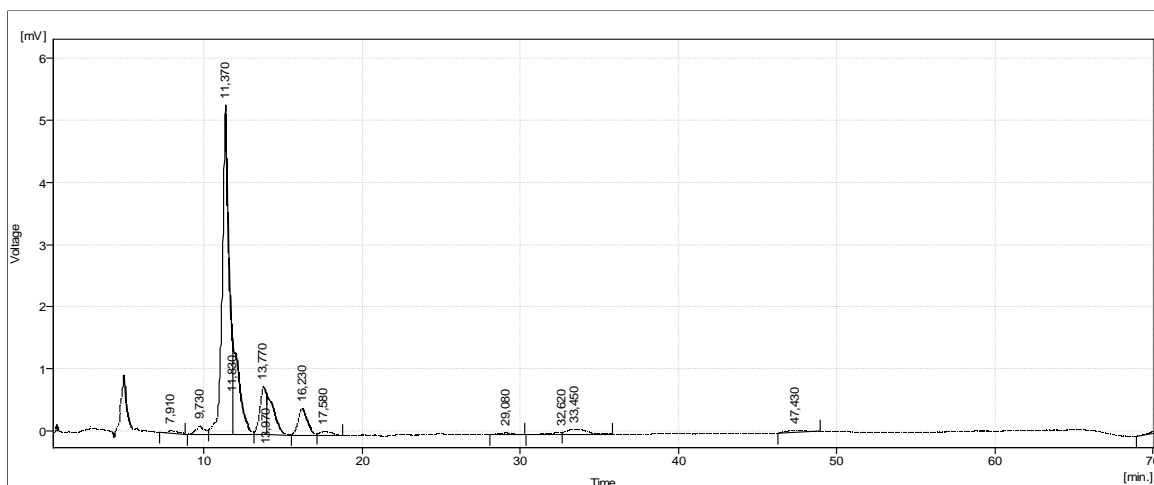
Graf 18. Změna poměru imaturních erytrocytů v závislosti na podávání karotenoidů. (0 – kontrola, 1- 0,012 g, 2 – 0,12 g, 3 – 1,2 g karotenoidů/den)



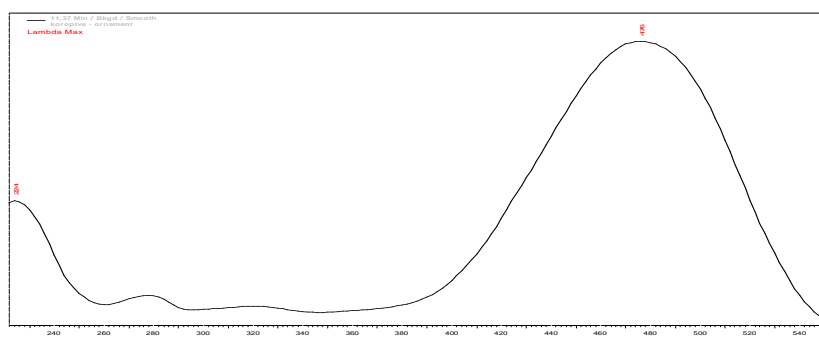
3.3. Karotenoidy v proužku za okem

Složky obsažené v nepolárním extraktu z tkáně očního proužku ukazovaly absorpční maxima při vlnové délce 450 nm a retenčních časech v rozmezí od 5 do 20 min (Obrázek 2). Ty jsou charakteristické pro oxidované karotenoidy. Nicméně lutein (retenční čas 12:00 min) a β -karoten (retenční čas 15:07 min) nebyli dominantními karotenoidy v našem vzorku. Po srovnání s tabulkovými hodnotami retenčních časů karotenoidů jsme stanovili, že karotenoid vyskytující se v největší míře obsahoval pravděpodobně jednu nebo více keto skupin. Na obrázku 3 je znázorněno spektrum nejvíce zastoupeného karotenoidu.

Obrázek 2. Chromatogram karotenoidů z HPLC karotenoidního ornamentu.



Obrázek 3. Spektrum nejvíce zastoupeného karotenoidu (11,37 min).



4. Diskuze

4.1. Karotenoidní ornament

Karotenoidní ornamenty jsou využívány mnoha druhy ptáků k čestné signalizaci jejich zdraví a kondice a na jejich základě si samice vybírají samce k reprodukci. Cílem mé práce bylo objasnit vztah těchto ornamentů s kondicí u koroptve polní a zjistit jejich potenciální význam v pohlavním výběru tohoto druhu. V první řadě bylo ale třeba potvrdit, že červeno-oranžový proužek za okem je skutečně zbarven karotenoidy.

Celá extrakce karotenoidů byla na prvním vzorku původně provedena podle protokolu sestaveného McGraw et al. (2004). Bohužel, ten extrahoval karotenoidy z peří, zatímco my jsme pracovali s kožním ornamentem a proto se nám v prvním vzorku jejich přítomnost nepotvrdila. Pozměnili jsme proto protokol a na jeho základě jsme již přítomnost karotenoidů zaznamenali. Zjistili jsme, že kožní proužek za okem je u koroptve polní zbarven karotenoidy. To je v souladu s pozorovanými znaky u ostatních druhů z řádu hrabavých (např. Egeland et al. 1993; Mougeot et al. 2008). Ačkoli jsme nebyli schopni přesně popsat pigmentové složení tohoto ornamentu (kvůli nedostupnosti standardů), je zřejmé, že obsahuje karotenoidy s konjugovanými keto skupinami, protože jejich absorpční spektra mají pouze jedno absorpční maximum, zatímco ostatní karotenoidy obecně vykazují absorpční spektra se třemi maximy (Britton et al. 1995). Tyto karotenoidy jsou v přírodě odpovědné za jasně červenou barvu (např. astaxanthin, canthaxanthin; Britton 1995). Jestli koroptev tento karotenoid získává z přírody, nebo ho získává metabolizací jiných přijatých karotenoidů by vyžadovalo další výzkum v této oblasti. Je známo, že vstřebávání xantofylů, mezi něž patří i ketokarotenoidy, je u ptáků preferováno (Schiedt 1998). Koroptev se živí převážně rostlinnou stravou (semena, tráva, kořínky, plody, občas hmyz), ve které se vyskytují hlavně lutein a zeaxanthin, které jsou nejdostupnějšími karotenoidy v přírodě. Oxidované a tedy i červenější karotenoidy se vyskytují hlavně v plodech.

4.2. Souvislost karotenoidního a melaninového ornamentu

V průběhu dvou let jsme sledovali populaci koroptve polní v okolí vesnice Milešín. Na tomto vzorku jsme chtěli objasnit funkci karotenoidních ornamentů jako čestných signálů kondice jedince. Jelikož kromě karotenoidního znaku produkuje koroptev ještě melaninový péřový ornament na hrudi, existovala zde možnost, že oba signály ukazují příjemci jinou informaci o kondici jedince (Johnstone 1996). Proto nás zajímalo, jestli spolu tyto dva ornamenty nějakým způsobem souvisejí. Jelikož melaninový ornament je péřový, měl by ukazovat spíše na kondici jedince v době přepeřování a karotenoidní ornament je kožní, a proto by mohl ukazovat aktuální kondici. Péřové ornamenty jsou ovšem také ovlivňovány působením parazitů (Shawkey et al. 2007), pera se mohou mechanicky obrušovat (Bonser 1994), a pokud je jedinec nemocný a nepečuje o své peří, také to ovlivní kvalitu jeho ornamentu. Tyto faktory mají však vliv spíše na parametry barvy ornamentu, než na jeho velikost, tu jsme však nesledovali, a proto v tomto směru nemůžeme učinit žádné další závěry. Na základě analýzy velikosti ornamentů jsme zjistili, že spolu jejich velikost průkazně souvisí a dokonce i barva karotenoidního signálu souvisí s velikostí podkovy (barvu podkovy jsme v této studii nesledovali) a velikostí karotenoidního proužku. To může souviset s celkovou velikostí jedince a jeho celkovou kondicí. Navzdory předpokladům, že ornamenty pigmentované melaniny a karotenoidy se liší v tom, co signalizují příjemci signálu, tomu tak být nemusí (Johnstone 1996, Griffith et al. 2006; Hill 2011). Záleží na tom, který znak je u kterého druhu využíván v pohlavním výběru. Přesto je stále možné, že každý ornament ukazuje na jinou část kondice, ale celkově zdravý jedinec produkuje oba ornamenty rozsáhle (Møller & Pomiankowski 1993, Johnstone 1996, Hill 2011). V pracích s druhy, které exprimují jednak karotenoidní a jednak melaninový znak, byla porovnávána souvislost těchto znaků s kondicí a s funkcí v pohlavním výběru (*Carpodacus mexicanus* - Hill et al. 1998, *Carduelis tristis* - McGraw et al. 2000). U obou druhů byla zjištěna pouze průkazná souvislost kondice s karotenoidním a ne s melaninovým znakem. Ovšem u druhů *Carpodacus mexicanus* i *Carduelis tristis* nejspíše melaninový znak není využíván v pohlavním výběru (Johnson et al. 1993; Badyaev & Hill 2000). Naopak například u sýkory koňadry (*Parus major*) existuje výběr na základě melaninového ornamentu (Fitze a Richner 2002) a u tohoto druhu je melaninový znak kondičně závislý, byla zjištěna ovšem i souvislost karotenoidního zbarvení s kondicí jedince (Senar et al. 2003). Druhem příbuzným koroptvi polní, který také exprimuje oba znaky je orebice rudá (*Alectoris rufa*), u něj byla sledována

negativní korelace mezi barvou karotenoidního a velikostí melaninového ornamentu (Alonso-Alvarez et al. 2011). Autoři to vysvětlují rozdílným působením oxidativního stavu na vývoj obou ornamentů.

4.3. Signalizace kondice jedince pomocí ornamentů

Dalším cílem této práce bylo zjistit souvislost kondice s karotenoidním proužkem a také melaninovou podkovou. Pokud znak průkazně koreluje se zdravím jedince, pak může být využit při pohlavním výběru. Na základě nově navrženého významu termínu kondice (Hill 2011), je signál čestný, protože signalizuje souvislost produkce znaku s funkčností životně důležitých buněčných procesů (dýchání, imunitní systém). Tyto systémy souvisí s celkovým zdravím jedince a ornament tak signalizuje celkovou kondici. Pokud bereme kondici jako funkčnost imunitního systému, pak se celkový vztah mezi zbarvením, odolností proti nemoci a oxidačním stavem stává lépe vysvětlitelným. Mnoho prací popisuje kondici jedince vždy vybráním pouze jedné sledované veličiny související s imunitou. Imunitní systém má však více složek a je tedy dobré sledovat více parametrů najednou, pro lepší odhadnutí kondice. Proto jsme si vybrali kromě nejběžněji používaného parametru v ekologických studiích na ptácích, kterým je měření otoku po podkožní aplikaci mitogenu PHA (jako ukazatele množství T lymfocytů v periferní krvi) i další parametry funkce imunitního systému. Také běžně používaný parametr poměru heterofilů a lymfocytů v krvi, zvýšený poměr těchto dvou buněčných typů je ukazatelem dlouhodobého stresu (Gross & Siegel 1983; Davis et al. 2004) a neměl by být ovlivněn stresem manipulačním. Dále absolutní počet erytrocytů a leukocytů v krvi a poměr imaturních (nezralých, dozrávajících erytrocytů) ku dospělým erytrocytům. Posledním sledovaným parametrem byla aktivita komplementu. Pokud je doba, po kterou komplement musí působit, aby zabil bakterie, příliš dlouhá, může to být způsobeno zhoršenými imunitními funkcemi, například v době reprodukce. Zajímalo nás tedy, jak tyto parametry souvisí s ornamenty a jestli jsou tak ornamenty čestnými indikátory kondice. Velikost karotenoidního proužku pozitivně korelovala s rychlostí komplementové aktivity. Naše výsledky dále ukazují, že pohlaví se liší ve schopnosti vypořádat se s bakteriální infekcí a toto se jinak promítá do signalizace ornamentu. Samičím s oranžovějším ornamentem trvalo zabíjení déle, naopak u samců byl delší poločas zabíjení bakterií pozorován v souvislosti s červenějším ornamentem. Odlišnost funkce imunitního systému v závislosti na pohlaví potvrzují například výsledky McGraw et al. (2005), u zebřičky pestré

(*Taenopygia guttata*), kdy samice vykazovali větší odpověď na PHA, která ukazovala na funkce buněčné imunity a samci větší odpověď na SRBC. Samci měli také vyšší hodnoty karotenoidů v krvi, ale barva zde nebyla sledována. U kardinála červeného (*Cardinalis cardinalis*) nesouviselo zbarvení karotenoidního peří s celkovou velikostí, ale sytější barva samců souvisela s vyšší hladinou H/L (Maney et al. 2008), a vyšší celkovým počtem leukocytů u samic. V obou pohlavích tak karotenoidní zbarvení pozitivně souviselo s imunitními znaky normálně spojenými s vyšším stresem a infekcí. Samci orebice rudé (*Alectoris rufa*) s červenějším zobákem a oční skvrnou měli méně parazitů a větší odpověď na PHA (Mougeot et al. 2009). Sytost karotenoidního ornamentu tak může souviset se stresem spojeným s vyšší reprodukční zátěží (související také s vyšší produkcí testosteronu), neboť jedinci tohoto druhu jsou preferenčně vybíráni na základě tohoto znaku. Mladí jedinci měli vyšší poměr imaturních erytrocytů, pokud měli oranžovější ornament, starší naopak při vysokém poměru erytrocytů červenější ornament. Zvýšený poměr imaturních erytrocytů může souviset s anémií, či nadměrnou ztrátou krve a je známo, že se liší mezi věky (Vinkler et al. 2010). Plocha podkovy samců pozitivně koreluje s otokem PHA a negativně s poměrem heterofilů ku lymfocytům. U sýkory koňadry (*Parus major*, Dufva a Allander 1995) vyšel poměr H/L naopak v pozitivní asociaci s melaninovým zbarvením.

4.4. Párování

Samci se rychleji párovali, pokud měli větší plochu karotenoidního proužku. Jak bylo řečeno výše, v naší studii byla potvrzena korelace barvy s velikostí ornamentu, ačkoli ve vlivu na párování vyšla průkazně pouze velikost, je možné, že i barva hraje roli. Pro ověření souvislosti párování s karotenoidním ornamentem by bylo třeba experimentálně ověřit samičí preference pro tento znak, pomocí manipulace barvením plochy proužku, nebo podáváním karotenoidů, které má vliv na rozsah a velikost skvrny. Červenější zobáček u zebříčky (*Taenopygia guttata*) pozitivně ovlivnil párování samců (Simons et al. 2012). Vliv barvy karotenoidního ornamentu byl potvrzen orebici rudou (*Alectoris rufa*), samice se při spárování se samcem, který měl experimentálně zlepšenou červenou barvu kožního ornamentu u oka a zobáku (nabarvení), produkovala průkazně více vajec (Alonso-Alvarez et al. 2012).

Což je v souladu se zjištěním, že pohlavní výběr u koroptyve polní nebyl potvrzen pro velikost melaninového ornamentu (Beani 1995). Pozorujeme-li ovšem párování

koroptve polní, je možné si povšimnout, že samec vypíná hrud' a předvádí samici především melaninovou podkovu na hrudi. Je možné, že tím prezentuje svou dominanci nad ostatními samci (Andersson 1994; Beani 1995; Griffith et al. 2006) a tím je atraktivnější pro samici, ovšem samice si vybírá výsledného samce podle jiných znaků. U tohoto druhu byl potvrzen výběr partnera na základě hlasových projevů (Beani 1995; Loyau et al. 2005). Péřové ornamenty mohou obecně signalisovat dlouhodobé znaky jedince, jako je sociální status (Mcgraw et al. 2003).

V této práci byla prokázána korelace obou typů ornamentů exprimovaných současně, jejich souvislost s kondicí, kdy každý ukazuje na odlišnou část kondice. Samci se také rychleji párovali, pokud měli větší karotenoidní proužek. Je možné, že u tohoto druhu si samice vybírá partnera na základě více současně přítomných znaků, což je v souladu s představou, že vliv jednotlivých signálů se spojuje a dohromady dávají ucelenou informaci o kondici jedince (Hill 2011).

4.5. Pokusné ověření hypotézy CMH

Pokus byl proveden na základě ověření nově navržené hypotézy CMH (Vinkler et al. 2010), podle které nemají karotenoidy antioxidační funkci a jsou spíše zdraví škodlivé a to zvláště ve vyšších dávkách a při současné stimulaci imunitního systému.

Předpokládali jsme žádný nebo negativní vliv podávání karotenoidů za dlouhodobé stimulace imunitního systému na barvu a velikost ornamentu. Tento předpoklad se ovšem nepotvrdil. Jedincům se v průběhu pokusu průkazně zlepšila barva (zčervenání) i velikost karotenoidního ornamentu. Tento vliv karotenoidů byl již mnohokrát potvrzen u různých druhů ptáků (např. *Carduelis tristis*, Shawkey et al. 2006, *Carpodacus maexicanus*, Hill 1992). Ve většině ostatních studií ovšem nepracovali s tak vysokými dávkami karotenoidů za současné stimulace imunity. Hill et al. (2009) provedli pokus, při kterém byla jedincům stimulována imunita (pomocí podávání parazitů - Coccidií) a u jednotlivých skupin byl rozdílný přístup k potravě a zároveň byly podávány karotenoidy. Barvu žlutého peří (*Carduelis tristis*) ovšem ovlivnily pouze karotenoidy, naproti tomu barva zobáku byla průkazně ovlivněna všemi třemi vlivy. Je možné, že dávky karotenoidů byly v našem pokusu tak velké, že i přes stimulaci imunity a negativního vlivu štěpných produktů karotenoidů měli jedinci stále dostatek karotenoidů pro ornament. Příjem karotenoidů je ovšem spíše pasivní záležitost a jedinci přijímají karotenoidy jen do určitého množství, jak již bylo řečeno v úvodu. Další přidávání karotenoidů vede k jejich ukládání do zásobních

tkání. Je možné, že jedinci přijímali tak vysoké dávky těchto pigmentů, že jejich vystavení do ornamentu bylo pouze pokusem o vyhnutí se jejich škodlivému vlivu (Mcgraw et al. 2011). Při dalším ověřování hypotézy CMH, by proto bylo třeba sledovat i množství štěpných produktů v plasmě jedince, případně množství ukládaných karotenoidů do zásobních tkání.

Dalším předpokládaným závěrem bylo, že jedinci s nejvyššími pokusnými dávkami se budou snažit vyhnout potravě bohaté na karotenoidy, což jsme v naší studii přímo nesledovali a k ověření tohoto předpokladu by bylo třeba dalších pokusů potravních preferencí. Nicméně dlouhodobá stimulace imunity vedla k průkaznému snížení váhy, ale nepodařilo se nám prokázat její přímý vliv na barvu, či plochu ornamentu. Podvyživení jedinci by mohli mít horší imunitní schopnosti a tím i celkovou kondici. Ve studiích s podáváním samotného LPS, toto vedlo ke snížení hodnoty karotenoidů v plasmě (Koutsos et al. 2003), ale i zblednutí barvy ornamentu (Alonso-Alvarez et al. 2004). Samci zebřiček vystavení manipulativnímu stresu zhubli, ale barva zobáku jim ztmavla (Mcgraw et al. 2011), při tom však měli zvýšenou hladinu stresového hormonu kortikosteronu a zároveň nízkou hladinu karotenoidů v krvi, je tedy možné, že se uvolnili karotenoidy ze zásobních tkání a organismus je „ukryl“ před oxidací do ornamentu.

Dávky karotenoidů neměly oproti našim očekáváním průkazný vliv na velikost otoku PHA ani na změnu v poměru imaturních erytrocytů, které se oba dají využít při popisování imunitních funkcí jedince. Neprůkazné výsledky byly nejspíše ovlivněny malou velikostí vzorku. Ovšem kontrolní jedinci měli na konci pokusu neprůkazně větší otok PHA a podávání karotenoidů vedlo ke zmenšení otoku. To mohlo být způsobeno sníženou obranyschopností jedinců, při které v periferní krvi nekoloval dostatek imunitních buněk dostupných pro reakci. Jelikož PHA by měla stimulovat spíše lokální imunitní reakci, může signalisovat menší počet buněk dostupných v okolí zánětu, probíhající imunitní reakci jinde v těle, čili zhoršení celkového stavu jedince. Ve většině studií byl zaznamenán po podání karotenoidů naopak větší otok, který byl vysvětlován jako zlepšení imunitní obrany jedince (Olson 1989; Blount et al. 2003; McGraw et al. 2003; Fitze et al. 2007). Cucco et al. (2007) pozoroval u koroptve polní (*Perdix perdix*) větší otok po PHA při současném podávání β -karotenu pouze u samic (ne u samců), tyto samice měly také více lysozymu (antibakteriální enzym), což naznačuje, že měly skutečně zlepšené imunitní funkce. Ovšem β -karoten je prekurzor vitamínu A a není využíván v ornamentaci, proto jeho pozitivní vliv na imunitu není tolik překvapující. Naše výsledky potvrzuje například práce McGraw et al. (2005), kdy suplementace karotenoidy vedla u samců k menšímu

otoku po PHA i vyšší hladině protilátek v krvi po aplikaci SRBC, autoři to vysvětlují tím, že samci mají díky vyššímu množství karotenoidů v plasmě lepší obranyschopnost, která u nich jinak může být horší kvůli působení testosteronu. Podávání karotenoidů u racka žlutohého (*Larus fuscus*) vedlo u samců k vyšší antioxidační aktivitě a vyšší koncentraci karotenoidů (Blount et al., 2002) a u samice k nižší koncentraci imunoglobulinů. Kuřata koroptve krmená vyššími koncentracemi karotenoidů vykazovala lepší imunitní odpověď než kontrola (Cucco et al. 2006; Fenoglio et al. 2002).

Interakce stimulace imunity a podávání karotenoidů se nám nepotvrdila u žádné skupiny sledovaných jedinců. To mohlo být způsobeno nevhodně navrženým pokusným plánem, kdy jsme jednak na jednotlivé pokusné dávky měli málo jedinců, a dále chyběly kontrolní skupiny, sledující vliv samotných bakterií při nepřítomnosti karotenoidů na barvu a velikost plochy.

5. Závěr

V této práci byla sledována souvislost kondice s ornamentací jedince a pohlavní výběr u druhu koroptve polní. Součástí byl i pokus k ověření nově navržené hypotézy o signalizaci kondice prostřednictvím karotenoidů (CMH).

- 1) Potvrdila se přítomnost karotenoidů v červeném kožním proužku za okem. Tento ornament se tedy může účastnit signalizace kondice a trade off spojeného s karotenoidy.
- 2) V této studii se prokázala souvislost melaninového a karotenoidního znaku a tento výsledek potvrzuje spíše platnost tvrzení, že jedinec produkuje více znaků najednou, aby minimalizoval chybu při vyhodnocování své kondice příjemcem signálu. Dále byla potvrzena souvislost karotenoidního i melaninového ornamentu s kondicí, vyjádřenou pomocí parametrů imunity, přičemž oba znaky průkazně korelovaly s jinou částí imunitního systému. Mohou tedy dohromady dávat celkový obraz o kondici jedince.
- 3) Možnost jedince spárovat se, souvisela s barvou karotenoidního ornamentu a samci se párovali rychleji, pokud měli větší plochu karotenoidního proužku, čili se prokázal vliv karotenoidního ornamentu na párování v naší populaci koroptve polní.
- 4) Nebyla prokázána signalizace špatné kondice jedince pomocí ornamentu při působení vysokých dávek karotenoidů a současné stimulaci imunity. Pouze pozitivní vliv karotenoidů na barvu ornamentu a negativní vliv stimulace imunity na váhu jedince. Výsledky tedy nepodporují hypotézu o škodlivosti karotenoidů u kondičně oslabených jedinců, ač výsledky změn v otoku po stimulaci PHA s ní nejsou v rozporu.

6. Literatura

- Alonso-Alvarez, C. et al., 2012. Adjustment of female reproductive investment according to male carotenoid-based ornamentation in a gallinaceous bird. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 66(5), pp.731–742.
- Alonso-Alvarez, C. & Galván, I., 2011. Free radical exposure creates paler carotenoid-based ornaments: a possible interaction in the expression of black and red traits. *PloS one*, 6(4), p.e19403.
- Alonso-alvarez, C. et al., 2004. An Experimental Test of the Dose-Dependent Effect of Carotenoids and Immune A ...
- Anon, Fenoglio, Cucco, Malacarne-Ethol. Ecol. Evol. 2002-
- Armstrong, G. A. & Hearst, J. E. (1996). Carotenoids .2. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *Faseb Journal* 10: 228-237.
- Azzi, A., Davies, K.J., & Kelly, F., 2004. Free radical biology – terminology and critical thinking. *FEBS Letters*, 558(1-3), pp.3–6.
- Badyaev, A. V. & Hill, G. E. (2000). Evolution of sexual dichromatism: contribution of carotenoid- versus melanin-based coloration. *Biological Journal of the Linnean Society* 69: 153-172.
- Badyaev, A. V., Hill, G. E., Dunn, P. O., & Glen, J. C. (2001). Plumage color as a composite trait: Developmental and functional integration of sexual ornamentation. *American Naturalist* 158: 221-235.
- Beani, L., 1995. Mate choice in the grey partridge, < xh: i> Perdix perdix</xh: i>: Role of physical and behavioural male traits. *Animal Behaviour*, pp.347–356.
- Bertrand, S., Faivre, B., & Sorci, G. (2006). Do carotenoid-based sexual traits signal the availability of non-pigmentary antioxidants? *Journal of Experimental Biology* 209: 4414- 4419.
- Bierer, T. L., Merchen, N. R., & Erdman, J. W., Jr. (1995). Comparative Absorption and Transport of Five Common Carotenoids in Preruminant Calves. *J. Nutr.* 125: 1569-1577.
- Blount, J.D. et al., 2003. Do individual branches of immune defence correlate? A comparative case study of scavenging and non-scavenging birds. , 2(January), pp.340–350.
- Bonser, R.H.C., 1994. MELANIN AND THE ABRASION RESISTANCE OF FEATHERS ' . ,
- Böhm, F. et al., 1998. Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 44(3), pp.211–5.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb Journal* 9: 1551-1558.

- Brush, A. H. & Power, D. M. (1976). House Finch Pigmentation - Carotenoid Metabolism and Effect of Diet. *Auk* 93: 725-739.
- Buchanan, K. L., Evans, M. R., Goldsmith, A. R., Bryant, D. M., & Rowe, L. V. (2001). Testosterone influences basal metabolic rate in male house sparrows: a new cost of dominance signalling? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268: 1337-1344.
- Burley, N. & Coopersmith, C. B. (1987). Bill Color Preferences of Zebra Finches. *Ethology* 76: 133-151.
- Campbell TW, Ellis CK (2007) *Avian and exotic animal hematology and cytology*. Blackwell, Ames
- Catoni, C., Peters, A. & Martin Schaefer, H., 2008. Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants. *Animal Behaviour*, 76(4), pp.1107–1119.
- Clark, R. M. & Furr, H. C. (2001). Absorption of canthaxanthin by the rat is influenced by total lipid in the intestinal lumen. *Lipids* 36: 473-475.
- Cohen, A. a et al., 2008. Interspecific associations between circulating antioxidant levels and life-history variation in birds. *The American naturalist*, 172(2), pp.178–93.
- Cohen, A. a. & McGraw, Kevin J., 2009a. No simple measures for antioxidant status in birds: complexity in inter- and intraspecific correlations among circulating antioxidant types. *Functional Ecology*, 23(2), pp.310–320.
- Cohen, A. a. & McGraw, Kevin J., 2009b. No simple measures for antioxidant status in birds: complexity in inter- and intraspecific correlations among circulating antioxidant types. *Functional Ecology*, 23(2), pp.310–320.
- Costantini, D. & Moller, A. P. (2008). Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Functional Ecology* 22: 367-370.
- Cucco, M et al., 2006. Effects of beta-carotene supplementation on chick growth, immune status and behaviour in the grey partridge, *Perdix perdix*. *Behavioural processes*, 73(3), pp.325–32.
- Cucco, Marco et al., 2007. Effects of beta-carotene on adult immune condition and antibacterial activity in the eggs of the Grey Partridge, *Perdix perdix*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 147(4), pp.1038–46.
- Davis, A.K., Cook, K.C. & Altizer, S., 2004. Leukocyte Profiles in Wild House Finches with and without Mycoplasmal Conjunctivitis, a Recently Emerged Bacterial Disease. *EcoHealth*, 1(4), pp.362–373.
- Davies, B. H. (1985). Carotenoid Metabolism in Animals - A Biochemists View. *Pure and Applied Chemistry* 57: 679-684.

- Davis AK (2005) Effect of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. *Journal of Field Ornithology* 76:334-338
- Ducrest, A., Keller, L. & Roulin, A., 2008. Pleiotropy in the melanocortin system , coloration and behavioural syndromes. , (July).
- del Val, E., Senar, J. C., Garrido-Fernandez, J., Jaren, M., Borrás, A., Cabrera, J., & Negro, J. J. (2009a). Hepatic conversion of red carotenoids in passerine birds. *Naturwissenschaften* 96: 989-991.
- del Val, E., Senar, J. C., Garrido-Fernandez, J., Jaren, M., Borrás, A., Cabrera, J., & Negro, J. J. (2009b). The liver but not the skin is the site for conversion of a red carotenoid in a passerine bird. *Naturwissenschaften* 96: 797-801.
- Edge, R. & Truscott, T.G., Prooxidant and antioxidant reaction mechanisms of carotene and radical interactions with vitamins E and C. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 13(11-12), pp.992-4.
- Evans, S.R., Summers, A.G.R. & Sheldon, B.C., 2012. Seasonality of carotenoid-based plumage coloration : modelling wavelength-specific change through spectral reconstruction. , (January), pp.234-243.
- Evans, M. R., Goldsmith, A. R., & Norris, S. R. A. (2000). The effects of testosterone on antibody production and plumage coloration in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 47: 156-163.
- Faivre, B., Gregoire, A., Preault, M., Cezilly, F., & Sorci, G. (2003). Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science* 300: 103.
- Faivre, B. et al., 2003. Bill colour and immunocompetence in the European blackbird. *Animal Behaviour*, 65(6), pp.1125-1131.
- Figuerola J, Munoz E, Gutierrez R, Ferrer D (1999) Blood parasites, leucocytes and plumage brightness in the Cirl Bunting, *Emberiza cirlus*. *Functional Ecology* 13:594-601
- FIGUEROLA, J. O. R. D. & SENAR, J. C. (2005). Seasonal changes in carotenoid- and melanin-based plumage coloration in the Great Tit *Parus major*. *Ibis* 147: 797-802.
- Fitze, P.S. et al., 2007. Carotenoid-based plumage colors and immune function: is there a trade-off for rare carotenoids? *The American naturalist*, 169 Suppl (january), pp.S137-44.
- Fitze, P. S. & Richner, H. (2002). Differential effects of a parasite on ornamental structures based on melanins and carotenoids. *Behav. Ecol.* 13: 401-407.
- Folstad, I. & Karter, A. J. (1992). Parasites, Bright Males, and the Immunocompetence Handicap. *American Naturalist* 139: 603-622.
- Furr, H. C. & Clark, R. M. (1997). Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *Journal of Nutritional Biochemistry* 8: 364-377.

- Griffith, S.C., Parker, T.H. & Olson, V. a., 2006. Melanin- versus carotenoid-based sexual signals: is the difference really so black and red? *Animal Behaviour*, 71(4), pp.749–763.
- Hegemann, A. et al., 2012. Immune function in a free-living bird varies over the annual cycle, but seasonal patterns differ between years. *Oecologia*.
- Hill, Geo E & Iii, W.R.B., 1998. Melanin-based plumage coloration in the house finche is unaffected by coccidial infection. , (February).
- Hill, Geoffrey E, Inouye, C.Y. & Montgomerie, R., 2002. Dietary carotenoids predict plumage coloration in wild house finches. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 269(1496), pp.1119–24.
- Hill, Geoffrey E, Hood, W.R. & Huggins, K., 2009. A multifactorial test of the effects of carotenoid access, food intake and parasite load on the production of ornamental feathers and bill coloration in American goldfinches. *The Journal of experimental biology*, 212(Pt 8), pp.1225–33.
- Hill, Geoffrey E, 2011. Condition-dependent traits as signals of the functionality of vital cellular processes. *Ecology letters*, 14(7), pp.625–34.
- Ho, C. C., de Moura, F. F., Kim, S. H., & Clifford, A. J. (2007). Excentral cleavage of beta- carotene in vivo in a healthy man. *Am J Clin Nutr* 85: 770-777.
- Horak P, Ots I, Murumagi A (1998) Haematological health state indices of reproducing Great Tits: a response to brood size manipulation. *Functional Ecology* 12:750-756
- Kalariya, N.M. et al., 2008. Carotenoid derived aldehydes-induced oxidative stress causes apoptotic cell death in human retinal pigment epithelial cells. *Experimental eye research*, 86(1), pp.70–80.
- Koutsos, E. a., Christopher Calvert, C. & Klasing, K.C., 2003. The effect of an acute phase response on tissue carotenoid levels of growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 135(4), pp.635–646.
- Krams, I. et al., 2012. Comparative Biochemistry and Physiology , Part A Heterophil / lymphocyte ratios predict the magnitude of humoral immune response to a novel antigen in great tits (*Parus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 161(4), pp.422–428.
- Loyau, A. et al., 2005. Multiple sexual advertisements honestly reflect health status in peacocks (*Pavo cristatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58(6), pp.552–557.
- Lucas AM, Jamroz BS (1961) Atlas of avian hematology. Agriculture Monograph 25, United States Department of Agriculture, Washington
- Maney, D.L. et al., 2008. Carotenoid-Based Plumage Coloration Predicts Leukocyte Parameters during the Breeding Season in Northern Cardinals (*Cardinalis cardinalis*). *Ethology*, 114(4), pp.369–380.

- McGraw, K J, 2005. Interspecific variation in dietary carotenoid assimilation in birds: links to phylogeny and color ornamentation. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 142(2), pp.245–50.
- McGraw, K J & Hill, G E, 2000. Differential effects of endoparasitism on the expression of carotenoid- and melanin-based ornamental coloration. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 267(1452), pp.1525–31.
- McGraw, Kevin J et al., 2002. Different colors reveal different information: how nutritional stress affects the expression of melanin- and structurally based ornamental plumage. *The Journal of experimental biology*, 205(Pt 23), pp.3747–55.
- McGraw, Kevin J & Ardia, D.R., 2003. Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: an experimental test. *The American naturalist*, 162(6), pp.704–12.
- McGraw, Kevin J & Parker, R.S., 2006. A novel lipoprotein-mediated mechanism controlling sexual attractiveness in a colorful songbird. *Physiology & behavior*, 87(1), pp.103–8.
- McGraw, Kevin J., Hudon, J., et al., 2004. A simple and inexpensive chemical test for behavioral ecologists to determine the presence of carotenoid pigments in animal tissues. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57(4), pp.391–397.
- McGraw, Kevin J., Wakamatsu, K., et al., 2004. You Can'T Judge a Pigment By Its Color: Carotenoid and Melanin Content of Yellow and Brown Feathers in Swallows, Bluebirds, Penguins, and Domestic Chickens. *The Condor*, 106(2), p.390.
- McGraw, K.J. & Ardia, D.R., 2005. Sex differences in carotenoid status and immune performance in zebra finches. , pp.251–262.
- McGraw, K.J., Dale, J. & Mackillop, E.A., 2003. Social environment during molt and the expression of melanin-based plumage pigmentation in male house sparrows (*Passer domesticus*). , pp.116–122.
- McGraw, K.J. & Gregory, A.J., 2004. Carotenoid pigments in male American goldfinches: what is the optimal biochemical strategy for becoming colourful? *Biological Journal of the Linnean Society*, 83(2), pp.273–280.
- McGraw, K.J., Lee, K. & Lewin, A., 2011. The effect of capture-and-handling stress on carotenoid-based beak coloration in zebra finches. , pp.683–691.
- Merrill, L., Rothstein, S.I. & Wingfield, J.C., 2012. Sex-specific variation in brown-headed cowbird immunity following acute stress: a mechanistic approach '. , pp.25–38.
- Monaghan, P., Metcalfe, N.B. & Torres, R., 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology letters*, 12(1), pp.75–92.
- Møller, A.P. & Pomiankowski, A. 1993: Why have birds got multiple sexual ornaments? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 32: 167-176

- Mordi, R.C. et al., 1993. Oxidative Degradation of P-Carotene and PI Apo-W-carotenal. , 49(4), pp.911–928.
- Mougeot, Francois, 2008. Ornamental comb colour predicts T-cell-mediated immunity in male red grouse *Lagopus lagopus scoticus*. *Die Naturwissenschaften*, 95(2), pp.125–32.
- Mougeot, Francois et al., 2009. Parasites, condition, immune responsiveness and carotenoid-based ornamentation in male red-legged partridge *Alectoris rufa*. *Journal of Avian Biology*, 40(1), pp.67–74.
- Nagao, A., 2004. Functions and Actions of Retinoids and Carotenoids : Building on the Vision of James Allen Olson Oxidative Conversion of Carotenoids to Retinoids and Other Products 1 , 2. , pp.237–240.
- Nara, E. et al., 2001. Acyclic carotenoids and their oxidation mixtures inhibit the growth of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Nutrition and cancer*, 39(2), pp.273–83.
- Negro, J.J. et al., 2000. Diet explains interpopulation variation of plasma carotenoids and skin pigmentation in nestling white storks. *Physiological and biochemical zoology : PBZ*, 73(1), pp.97–101.
- Olson, J. a, 1989. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of beta-carotene into vitamin A. *The Journal of nutrition*, 119(1), pp.105–8.
- Palozza, P., 1998. Prooxidant actions of carotenoids in biologic systems. *Nutrition reviews*, 56(9), pp.257–65.
- Parker, R. S. (1996). Carotenoids .4. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *Faseb Journal* 10: 542-551.
- Perez-Rodriguez, L. et al., 2008. Cell-mediated immune activation rapidly decreases plasma carotenoids but does not affect oxidative stress in red-legged partridges (*Alectoris rufa*). *The Journal of experimental biology*, 211(Pt 13), pp.2155–61.
- Peters, A., Denk, A. G., Delhey, K., & Kempenaers, B. (2004). Carotenoid-based bill colour as an indicator of immunocompetence and sperm performance in male mallards. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 1111-1120.
- Quesada, J., Senar, J.C. & Val, E., 2010. Age-Related Differences in a Carotenoid-Based Coloration Trait are Due to Within-Individual Changes in Great Tits *Parus major* Age-related differences in a carotenoid-based coloration trait are due to within-individual changes in Great Tits *Parus major*. , 98(2), pp.179–184.
- Rao, a V. & Rao, L.G., 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 55(3), pp.207–16.
- Saks, L., McGraw, K., & Horak, P. (2003). How feather colour reflects its carotenoid content. *Functional Ecology* 17: 555-561.

- Salerno, C et al., 2005. Effect of carotenoid oxidation products on neutrophil viability and function. *BioFactors (Oxford, England)*, 24(1-4), pp.185–92.
- Shawkey, M. D., Pillai, S. R., & Hill, G. E. (2009). Do feather-degrading bacteria affect sexually selected plumage color? *Naturwissenschaften* 96: 123-128.
- Siems, W., Sommerburg, O., Schild, L., Augustin, W., Langhans, C. D., & Wiswedel, I. (2002). beta-Carotene cleavage products induce oxidative stress in vitro by impairing mitochondrial respiration. *Faseb Journal* 16: 1289-+.
- Siems, W., Wiswedel, I., Salerno, C., Crifo, C., Augustin, W., Schild, L., Langhans, C. D., & Sommerburg, O. (2005). beta-carotene breakdown products may impair mitochondrial functions - potential side effects of high-dose beta-carotene supplementation. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16: 385-397.
- Sies, H. (1993). Strategies of Antioxidant Defense. *European Journal of Biochemistry* 215: 213-219.
- von Schantz, T. et al., 1999. Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 266(1414), pp.1–12.
- Senar, J.C., Figuerola, Jordi & Domènech, J., 2003. Plumage coloration and nutritional condition in the great tit *Parus major*: the roles of carotenoids and melanins differ. *Die Naturwissenschaften*, 90(5), pp.234–7.
- Shawkey, M.D. et al., 2006. An experimental test of the contributions and condition dependence of microstructure and carotenoids in yellow plumage coloration. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 273(1604), pp.2985–91.
- Shawkey, M.D. et al., 2007. Bacteria as an agent for change in structural plumage color: correlational and experimental evidence. *The American naturalist*, 169 Suppl (january), pp.S112–21.
- Siems, Werner et al., 2005. Beta-carotene breakdown products may impair mitochondrial functions--potential side effects of high-dose beta-carotene supplementation. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(7), pp.385–97.
- Siems, Werner et al., _{NL} -Carotene cleavage products induce oxidative stress in vitro by impairing mitochondrial respiration 1. , pp.1289–1291.
- Simons, M.J.P., Cohen, A.A. & Verhulst, S., 2012. What Does Carotenoid-Dependent Coloration Tell ? Plasma Carotenoid Level Signals Immunocompetence and Oxidative Stress State in Birds – A Meta-Analysis. , 7(8).
- Stoddard, M.C. & Prum, R.O., 2011. How colorful are birds? Evolution of the avian plumage color gamut. *Behavioral Ecology*, 22(5), pp.1042–1052.
- Stradi, R., Pini, E., & Celentano, G. (2001). Carotenoids in bird plumage: the complement of red pigments in the plumage of wild and captive bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 128: 529-535.

- Toral, G.M., Figuerola, J & Negro, J.J., 2008. Multiple ways to become red: pigment identification in red feathers using spectrometry. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 150(2), pp.147–52.
- Vershinin, A. (1999). Biological functions of carotenoids - diversity and evolution. *Biofactors* 10: 99-104.
- Vinkler, M. et al., 2010. Haematological health assessment in a passerine with extremely high proportion of basophils in peripheral blood. *Journal of Ornithology*, 151(4), pp.841–849.
- Vinkler, M. & Albrecht, Tomás, 2010. Carotenoid maintenance handicap and the physiology of carotenoid-based signalisation of health. *Die Naturwissenschaften*, 97(1), pp.19–28.
- Young, A. J. & Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385: 20-27.
- Zahavi, A. 1975. Mate selection – a selection for handicap. *Journal of theoretical Biology* 53: 205-214.